



**Zita Dinis Lopes da Silva**

Licenciada em Biotecnologia

**Ocorrência, diagnóstico molecular e  
resistência a antifúngicos de *Candida* sp.  
de infecções vaginais em Portugal e  
Cabo-Verde**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria da Luz Marques Martins  
Investigadora Auxiliar  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Prof<sup>a</sup>. Doutora Elsa Maria Leclerc Duarte

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria da Luz Marques Martins



**Zita Dinis Lopes da Silva**

Licenciada em Biotecnologia

**Ocorrência, diagnóstico molecular e  
resistência a antifúngicos de *Candida* sp.  
de infecções vaginais em Portugal e  
Cabo-Verde**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria da Luz Marques Martins  
Investigadora Auxiliar  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Prof<sup>a</sup>. Doutora Elsa Maria Leclerc Duarte

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria da Luz Marques Martins

**Março 2013**





Ocorrência, diagnóstico molecular e resistência a antifúngicos de *Candida* sp. de infecções vaginais em Portugal e Cabo-Verde

Copyright Zita Dinis Lopes da Silva, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

- ◆ À professora Maria da Luz: “O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira” (William Arthur Ward).  
Obrigada por todos os ensinamentos, todos os momentos, conversas, entusiasmo, preocupação, dedicação. Obrigada por me apoiar incondicionalmente e alinhar nas minhas ideias “malucas e mirabolantes”.  
É impossível deixar em papel o verdadeiro sentimento mas digo: obrigada por ter aceite ser orientadora e mestre deste meu pedaço de vida, e espero continuar a poder partilhar consigo os ensinamentos desta vida.
- ◆ À técnica superior Ana Paula Maduro: “Todo o nosso saber começa nos sentimentos” (Leonardo da Vinci).  
Paulina, este ano imenso foi uma experiência incrível e tu foste essencial. Dedicada incondicionalmente, estavas lá em todos os momentos, nem que fosse para me chamar à razão obrigando-me a deixar de lado os delírios ocasionais do stress e voltar à terra, encarando tudo de forma calma e ponderada.
- ◆ À Ângela Fernandes, obrigada por estares ali comigo, por todos os momentos que passámos juntas, pelas conversas em crioulo. Obrigada por me deixares sempre alegre e ouvires as minhas angústias e me fazeres parar para pensar, por trazeres calma e harmonia para o laboratório.
- ◆ À Esmeralda, a angolana mais bem disposta à face da terra. Obrigada por seres minha mamã nestes poucos meses que partilhámos juntas o laboratório. Pela preocupação, pelo carinho, pela amizade, pelos sorrisos e compreensão.
- ◆ À Doutora Alice Correia, ginecologista e obstetra da Maternidade Alfredo da Costa (MAC): “Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.” (Albert Einstein)  
Alice, tia querida do coração, obrigada por teres acreditado no meu pequeno sonho e permitir que ele crescesse e se tornasse no resultado que agora apresento.
- ◆ À Doutora. Isabel Lourenço e às técnicas do laboratório de microbiologia da MAC, muito obrigada por me guardarem as “meninas”.
- ◆ Ao Conselho de Ética da MAC por permitir a minha parceria com a MAC e em especial à Doutora Teresinha Simão, obrigada por toda a ajuda.
- ◆ À D. João, à D. Maria, à Mónica e à Filomena, obrigada por toda a ajuda, carinho e amizade e também pela paciência na procura dos processos.
- ◆ Ao François Goris pelo interesse no meu trabalho e pela disponibilização dos óleos essenciais.
- ◆ Ao professor João Inácio e professora Sónia Inácio pela preciosa ajuda com os programas de sequenciação e conceitos de estatística.

- ◆ À Doutora Yorlaris Rosabal, que com grande interesse e afinho se disponibilizou para me representar em Cabo-Verde na dura luta de conseguir todas as autorizações necessárias. Yoli, não tenho como agradecer o quão fantástica foste. Permitiste-me concretizar uma parte muito importante do meu trabalho e também vivenciar experiências incríveis nesse maravilhoso país que é Cabo-Verde.
- ◆ À Dra. Ricardina, à Doutora Elisa e à Dra. Ivandra, à Enfermeira Natália, à Enfermeira Vitória obrigada por todo o apoio e disponibilidade.
- ◆ À Doutora Helena, à Cláudia e à Valdira, obrigada pelo carinho, apoio, amizade, conversas e disponibilidade. Tornaram a minha estadia no Hospital Agostinho Neto em algo muito agradável e que deixou saudades. Espero poder voltar a trabalhar com vocês.
- ◆ Ao Delegado da Praia, Dr. António Teixeira, ao Director Nacional de Saúde Dr. António Pedro Delgado, e à presidente do Comité de ética para a Saúde de Cabo-Verde Maria da Conceição Moreira Carvalho, obrigada pela atenção e permissão para que pudesse realizar o meu trabalho na Cidade da Praia, Ilha de Santiago.
- ◆ À Danuta e ao Filú, por terem sido como pais enquanto estive em Cabo-Verde, sempre velando para que tudo corresse bem em meu favor. Adorei estar com vocês.
- ◆ À minha avó, por todo o amor e carinho, sem nunca me deixar sair de casa sem almoçar um prato de arroz com feijão.
- ◆ À tia Marizta e ao Tio Tober, obrigada por toda a ajuda.
- ◆ À tia Lú, por todo o amor, preocupação, ensinamentos e conversas de muitas horas.
- ◆ Ao Jorge por todo o apoio, por todas as ideias maravilhosas e hilariantes, por todo o carinho e por esta maravilhosa amizade que começou no final de outra importante etapa.
- ◆ Às minhas gurias lindas e maravilhosas, que sempre me apoiam e dão força para avançar com segurança e certeza que tudo vai correr bem.
- ◆ Ao meu pessoal de Lisboa (Adán, Gerson, Rasa, Dinis, Marta, Ana, Matteo...) obrigada pelo apoio e força.
- ◆ À minha “Big Family” (Cátia, Bengas, Helder, Tisha, Pc e Sofy) por estarem sempre lá, sempre quando eu mais preciso, a postos para me ajudarem e confortarem e me darem a força necessária para continuar.
- ◆ Às XAMIZI, Xana e Miká por me encherem a vida de sorrisos e carinho e me mostrarem a visão artística da vida.
- ◆ A todos os meus amigos cá da terra, um muito obrigada por todo o apoio.
- ◆ À minha mamã: “Não podemos temer nunca quando temos uma mãe poderosa e amorosa que vela por nós”. (Daniel Comboni).

Mamã, és tudo para mim. Sem ti sinto-me perdida, és o meu guia e porto seguro. Só por saber que estás aqui já consigo encarar tudo com garra e segurança. Obrigada por acreditares na tua filha e lhe mostrares o verdadeiro valor da vida.

- ◆ Ao meu papá: Papá, sei que por vezes sigo caminhos um pouco diferentes do que idealizas mas também sei que estás presente para me apoiar.
- ◆ Aos meus irmãos, que tornam a minha vida cheia de alegrias, ajudando-me a encarar os diversos problemas de forma sábia.
- ◆ Ao Viju, companheiro, amigo, amor, parceiro. Thank you for every hours, minutes and seconds. For all meals, all love and care, all points of view. Thank you for every moment be there, praying for me, thinking of me. Thank you for making things more simply and easy. Thank you for helping me in this time, showing all your comprehension. And thank you for share this life with me ☺.



## Resumo

As leveduras *Candida* sp. encontram-se entre os principais agentes patogénicos causadores de infecções fúngicas vaginais, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequente. Contudo, a realidade em África quanto à sua prevalência como agentes infecciosos é praticamente desconhecida, incluindo em Cabo-Verde onde é totalmente incógnita.

Neste trabalho foram estudados 142 isolados clínicos de duas proveniências: Portugal e Cabo-Verde. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente (85% e 69%, respectivamente), estando *Candida glabrata* em segundo lugar entre os isolados de Portugal (8%) e *Candida parapsilosis* entre os isolados de Cabo-Verde (19%). Verificou-se a importância da utilização dos métodos moleculares (PCR multiplex e PCR-RFLP) que demonstraram ser simples, mais rápidos e eficazes, possíveis de ser aplicados em rotina nos laboratórios de microbiologia, nomeadamente laboratórios hospitalares por actualmente já não serem muito dispendiosos. A pesquisa da nova espécie *C. africana* entre os isolados clínicos de Cabo-Verde, mostrou a presença de quatro isolados desta espécie.

Apesar de neste trabalho se ter verificado uma elevada sensibilidade dos isolados clínicos dos dois países ao fluconazol e ao voriconazol, nestes últimos anos tem-se verificado um aumento de resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos azólicos, envolvendo a acção do gene *ERG11*. Procurou-se, deste modo, pesquisar a existência de mutações ao nível deste gene, bem como procurar alternativas aos antifúngicos convencionais pesquisando novas opções de actividades antifúngicas a partir de plantas medicinais. A análise feita às sequências do gene *ERG11* envolvido na resistência aos fármacos demonstrou existirem diferenças entre os isolados sensíveis e os resistentes aos azóis fluconazol e voriconazol. Foram ainda testados óleos essenciais, onde os de *Lavandula latifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* apresentaram acção antifúngica. Com este trabalho foi, por fim, possível conhecer parte da realidade cabo-verdiana quanto à prevalência de leveduras *Candida* sp. como agentes de vulvovaginite.

Palavras-chave: Candidíase vulvovaginal, *Candida* sp., Métodos moleculares, Fluconazol, Voriconazol, Óleos essenciais.



## Abstract

The yeasts *Candida* sp. are among the major pathogens causing fungal vaginal infections, being *Candida albicans* the most common species. Its prevalence as infectious agents in Africa is practically unnoted, including in Cape Verde, where it is totally unknown.

This work studied 142 clinical isolates from two sources: Portugal and Cape Verde. *C. albicans* was found as the most prevalent species (85% and 69%, respectively), with *Candida glabrata* the second among isolates from Portugal (8%) and *Candida parapsilosis* the second from Cape Verde (19%). We tested the use of molecular methods (PCR and multiplex PCR-RFLP) that proved to be simple, faster and more efficient, useful to be applied in routine microbiology laboratories, including hospital laboratories, because nowadays are no longer expensive. It was found four isolates of the new species *C. africana* among clinical isolates of Cape Verde.

Despite this work have shown a high sensitivity of clinical isolates of both countries to fluconazole and to voriconazole, recently there has been a global increase in resistance of *Candida* species to antifungal azoles, involving the action of the gene *ERG11*. We sought to investigate the existence of mutations at this gene, as well as seeking alternatives to conventional antifungals, researching new options of antifungal activities from medicinal plants. The analysis of the *ERG11* gene sequences involved in drug resistance showed some differences between sequences of sensitive and resistant isolates to fluconazole and voriconazole. Also were tested some essential oils against clinical isolates, and *Lavandula latifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* showed antifungal *in vitro* activity. Finally, this work allowed us to evaluate part of the Cape Verdean reality regarding the prevalence of yeast *Candida* sp. as agents of vulvovaginitis.

Keywords: Vulvovaginal candidiasis, *Candida* sp., Molecular methods, Fluconazole, Voriconazole, Essential oils.





## Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	V
Abstract	VII
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XIII
1. Introdução	1
1.1. Os fungos e o Homem	1
1.2. Micologia	2
1.3. Características gerais dos fungos	3
1.4. Leveduras de interesse clínico	5
1.4.1. Leveduras do género <i>Candida</i>	5
1.5. O diagnóstico laboratorial da candidíase vaginal	11
1.5.1. Identificação convencional de leveduras em Micologia Médica	12
1.5.2. Métodos de identificação moleculares	13
1.6. Antifúngicos	15
1.6.1. Antifúngicos convencionais	16
1.6.2. Antifúngicos naturais	18
1.6.3. Susceptibilidade aos antifúngicos convencionais e naturais	21
1.7. Objectivos do trabalho realizado e plano da dissertação	22
2. Materiais e métodos	25
2.1. Origem e colheita dos isolados	25
2.2. Isolamento, identificação e manutenção dos isolados	26
2.3. Identificação convencional	27
2.3.1. Exame directo	27
2.3.2. Teste da Blastese	28
2.3.3. Testes bioquímicos	28
2.4. Identificação molecular	29
2.4.1. Identificação de espécies de <i>Candida</i> pela técnica de PCR multiplex	30
2.4.2. Identificação de espécies de <i>Candida</i> pela técnica de PCR-RFLP	32
2.5. Amplificação do gene <i>HWP1</i>	35
2.6. Amplificação e sequenciação do gene <i>ERG11</i>	37
2.7. Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos isolados clínicos do género <i>Candida</i>	38
2.7.1. Método de Kirby-Bauer ou de difusão em disco	38
3. Resultados	41
3.1. Origem e caracterização dos isolados	41

3.2. Identificação convencional (Exame directo, Teste da Blastese, ID23C®)	42
3.3. Identificação molecular	44
3.3.1. PCR multiplex	44
3.3.2. PCR-RFLP	45
3.4. Amplificação do gene <i>HWP1</i>	45
3.5. Comparação de sequências do gene <i>ERG11</i>	46
3.6. Testes de sensibilidade aos antifúngicos	48
3.6.1. Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> pelo método de Kirby-Bauer aos antifúngicos convencionais	48
3.6.2. Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> pelo método de Kirby-Bauer aos óleos essenciais e extracto vegetal	50
4. Discussão	51
4.1. Avaliação da população	51
4.2. Métodos convencionais	52
4.2.1. Exame directo	53
4.2.2. Teste da Blastese	55
4.2.3. Métodos bioquímicos de identificação de leveduras	56
4.3. Métodos de identificação molecular	57
4.4. Ocorrência das espécies de <i>Candida</i> nos dois locais estudados	60
4.5. Amplificação do gene <i>HWP1</i>	61
4.6. Sequenciação do gene <i>ERG11</i>	63
4.7. Testes de sensibilidade aos antifúngicos	64
4.7.1. Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos convencionais pelo método de Kirby-Bauer	64
4.7.2. Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> aos óleos essenciais e extracto vegetal pelo método de Kirby-Bauer	67
4.8. Conclusões	69
4.9. Perspectivas futuras	73
5. Bibliografia	75
Anexos	81
Anexo 1	81
Anexo 2	87
Anexo 3	93
Anexo 4	95

## Índice de figuras

Figura 1.1	A-Fungos leveduriformes ( <i>Candida</i> spp.); B-Fungo filamentoso ( <i>Microsporum gypseum</i> )	4
Figura 1.2	Candidíase vaginal	10
Figura 1.3	<i>Rosmarinus officinalis</i> e as suas propriedades	19
Figura 1.4	<i>Melaleuca alternifolia</i> e as suas propriedades medicinais	19
Figura 1.5	<i>Lavandula latifolia</i> e as suas propriedades medicinais	20
Figura 1.6	Grainha de toranja e as suas propriedades medicinais	21
Figura 2.1	Culturas de espécies do género <i>Candida</i> em placa de <i>petri</i>	26
Figura 2.2	Culturas de espécies do género <i>Candida</i> em tubo com rolha de algodão	26
Figura 2.3	Esquema representativo da metodologia utilizada para identificação dos isolados clínicos	28
Figura 2.4	Esquema representativo da organização dos genes ribossómicos e dos <i>primers</i> universais e específicos das diferentes espécies de <i>Candida</i>	30
Figura 2.5	Esquema representativo das bandas esperadas depois da amplificação do PCR multiplex do DNA das espécies de <i>Candida</i> mais comuns de candidíase	32
Figura 3.1	Estruturas fúngicas observadas nas 216 amostras estudadas	42
Figura 3.2	Observação de tubos germinativos num Teste de Blastese positivo (amostra 17)	42
Figura 3.3	Resultados da identificação convencional dos isolados de Portugal (por Teste da Blastese e por API, ID32 <sup>®</sup> , BioMérieux, França)	43
Figura 3.4	Resultados da identificação convencional dos isolados de Cabo-Verde (por Teste da Blastese e por API, ID32 <sup>®</sup> , BioMérieux, França)	43
Figura 3.5	Resultados da identificação dos isolados provenientes de Portugal pela técnica de PCR multiplex	44
Figura 3.6	Resultados da identificação dos isolados provenientes de Cabo-Verde pela técnica de PCR multiplex	44
Figura 3.7	Resultados da identificação pela técnica de PCR-RFLP dos isolados provenientes de Portugal	45
Figura 3.8	Bandas resultantes da amplificação por PCR do gene <i>HWP1</i> dos isolados provenientes de Cabo-Verde anteriormente identificados como sendo <i>C. albicans</i>	46
Figura 3.9	Resultados referentes aos testes de sensibilidade ao fluconazol pelo método de Kirby-Bauer dos isolados provenientes de Portugal e Cabo-Verde, discriminados por espécie	49
Figura 3.10	Resultados referentes aos testes de sensibilidade ao voriconazol pelo método	

	de Kirby-Bauer dos isolados provenientes de Portugal e Cabo-Verde, discriminados por espécie	49
Figura 3.11	Resultados em termos percentuais referentes aos testes de sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol pelo método de Kirby-Bauer dos isolados provenientes de Portugal, discriminados por espécie	49
Figura 3.12	Resultados em termos percentuais referentes aos testes de sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol pelo método de Kirby-Bauer dos isolados provenientes de Cabo-Verde, discriminados por espécie	50

## Índice de tabelas

Tabela 1.1	Áreas de aplicação dos fungos	1
Tabela 1.2	Fungos como organismos patogénicos	2
Tabela 1.3	Grupos de micoses e respectivos exemplos	3
Tabela 1.4	Características morfológicas microscópicas com respectivas ilustrações e características macroscópicas de algumas espécies patogénicas de <i>Candida</i>	6
Tabela 1.5	Aspectos clínicos da candidíase vaginal: factores predisponentes e sintomatologia	11
Tabela 2.1	Procedimentos utilizados na identificação convencional de todos os isolados clínicos de leveduras isoladas de candidíases vaginais provenientes da cidade da Praia, Cabo-Verde e da cidade de Lisboa, Portugal.	27
Tabela 2.2	Qualidade da identificação feita pelo sistema ID32® (BioMérieux, França)	29
Tabela 2.3	<i>Primers</i> específicos utilizados para cada espécie e dimensão dos fragmentos esperados após amplificação por PCR multiplex	30
Tabela 2.4	Mistura reaccional usada nas reacções de PCR multiplex para a identificação de isolados clínicos do género <i>Candida</i>	31
Tabela 2.5	Sequência oligonucleotída dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4	33
Tabela 2.6	Mistura reaccional usada nas reacções de PCR para amplificação da região ITS do DNA ribossómico de isolados clínicos do género <i>Candida</i>	33
Tabela 2.7	Sequência e região de corte identificada pela enzima de restrição <i>Msp</i> 1	34
Tabela 2.8	Mistura reaccional usada em cada reacção de restrição coma enzima <i>Msp</i> 1 para a identificação de isolados clínicos do género <i>Candida</i>	34
Tabela 2.9	Dimensões das bandas da região ITS do DNA ribossómico de diferentes espécies do género <i>Candida</i> e dimensões das bandas após restrição com enzima <i>Msp</i> 1	35
Tabela 2.10	Sequência oligonucleotídica dos <i>primers</i> CR-f e CR-r	36
Tabela 2.11	Mistura reaccional usada nas reacções de PCR para amplificação do gene <i>HWP1</i> dos isolados clínicos de leveduras da espécie <i>C. albicans</i> provenientes de Cabo-Verde	36
Tabela 2.12	<i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>ERG11</i> e dimensão dos fragmentos esperados após PCR	37
Tabela 2.13	Mistura reaccional utilizada na reacção de PCR para a amplificação do gene <i>ERG11</i> dos quatro isolados clínicos da espécie <i>C. albicans</i>	37
Tabela 2.14	Critérios de interpretação dos halos de inibição e respectivas CMI's para o fluconazol e o voriconazol	40
Tabela 2.15	Critérios de interpretação dos halos de inibição para os óleos essenciais e	

	extracto vegetal	40
Tabela 3.1	Percentagem de isolados clínicos obtidos de Portugal (PT) e Cabo-Verde (CV) em relação aos grupos etários das doentes	41
Tabela 3.2	Número total de espécies provenientes de isolados clínicos de Portugal e de Cabo-Verde identificadas conjuntamente pelo método convencional ID32C® (BioMérieux, França) e pelos métodos moleculares PCR multiplex e PCR-RFLP	45
Tabela 3.3	Diferenças nucleotídicas encontradas no primeiro e segundo segmentos de gene <i>ERG11</i> entre as estirpes sensíveis e as estirpes resistentes aos antifúngicos fluconazol e voriconazol	47

# 1 – Introdução

"Não se conhece completamente uma ciência enquanto não se souber da sua história."

Auguste Comte, filósofo francês

## 1.1. Os fungos e o Homem

Os fungos são organismos muito versáteis que vivem em quase todos os habitats (San-Blas e Calderone, 2004). Já foram descritas mais de 90.000 espécies mas estima-se que exista 1,5 milhões de espécies no total (Willey *et al.*, 2008). Destas, cerca de 150 espécies têm-se revelado patogénicas ao Homem (Forbes *et al.*, 2002).

A micologia, ciência que estuda os fungos, só recentemente apareceu na história humana mas a relação entre fungos e homens vem desde a antiguidade. Já em 3100 a.C. os fungos estavam presentes da vida do Homem estando descrita nos hieróglifos egípcios a produção de pão e bebidas cujo fabrico envolvia fermentação (pão, queijo, vinho e cerveja).

Ao longo dos séculos os fungos foram ganhando cada vez mais importância na vida do homem estando presentes em várias áreas representadas na tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Áreas de aplicação dos fungos.

Área	Aplicação	Referências bibliográficas
<b>Alimentação</b>	Produção de pão, produtos lácteos, cerveja e vinho. Ingestão de cogumelos. Probióticos. Processamento de águas resultantes da produção de produtos alimentícios. Conservação de alimentos.	(Fleet, 2007) (Justino <i>et al.</i> , 2009) (Sharma <i>et al.</i> , 2009)
<b>Agricultura</b>	Controlo de pragas: os fungos são utilizados como armas biológicas para combater nemátodos, bactérias, ácaros, insectos e até outros fungos.	(Meylin e Eilenberg, 2007) (Tobin <i>et al.</i> , 2008) (Morales <i>et al.</i> , 2008) (Gurulingappa <i>et al.</i> , 2010) (Vega <i>et al.</i> , 2009) (Medo e Cagán, 2011)
<b>Bioremediação</b>	Utilização de fungos para degradação de, combustíveis fósseis, metais pesados. Tratamento de águas residuais.	(Zafar <i>et al.</i> , 2007) (Yang <i>et al.</i> , 2012)
<b>Investigação científica</b>	Grande importância no estudo de processos biológicos sendo a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , um organismo modelo no meio científico.	(Willey <i>et al.</i> , 2008)



(Continuação da tabela 1.1)

<b>Medicina</b>	Produção de fármacos como os antibióticos e imunossupressores. Produção de insulina	(Willey <i>et al.</i> , 2008) (Lange, 2010)
<b>Energias renováveis</b>	Produção de bioetanol	(Amore e Faraco, 2012) (Hasunuma e Kondo, 2012)

Por outro lado a presença dos fungos na nossa vida por vezes nem sempre é benéfica. Em certas circunstâncias pode ser mesmo prejudicial para o Homem. Na seguinte tabela (tabela 1.2) são apresentados alguns exemplos:

Tabela 1.2 – Fungos como organismos patogénicos.

Área	Desvantagem	Referências bibliográficas
<b>Alimentação</b>	Contaminação de produtos alimentares e água. Produção de micotoxinas.	(Lincy <i>et al.</i> , 2008) (Amézqueta <i>et al.</i> , 2012)
<b>Natureza</b>	Infecções em plantas e animais	(Horbach <i>et al.</i> , 2011) (Dial, 2007)
<b>Medicina</b>	Infecções fúngicas: micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistémicas e oportunistas.	(Forbes <i>et al.</i> , 2002)

## 1.2. Micologia

A micologia, ciência que estuda os fungos, tem ganho ao longo dos tempos uma crescente importância especialmente na área da medicina. Infecções por fungos patogénicos oportunistas têm-se tornado um grande problema clínico nas últimas décadas (Morschhäuser, 2010). Na realidade, a história da micologia médica já data desde 1835 com as observações de Bassi e Balsami que concluíram que a *Muscardine*, uma doença que afecta os bichos-da-seda, era provocada por um fungo (Simons, 1954).

De forma a facilitar o diagnóstico e posterior tratamento, as micoses têm sido agrupadas em três grupos consoante a sua localização no organismo: micoses superficiais ou cutâneas, subcutâneas e sistémicas. Cada um destes grupos pode conter espécies que também são consideradas oportunistas na medida em que provocam infecção no seguimento do aparecimento de outra doença que consequentemente tenha levado à diminuição da eficiência do sistema imunitário. Na tabela 1.3 encontram-se descritos os três grupos com respectivos exemplos de micoses pertencentes a cada categoria bem como referências às infecções oportunistas.

Tabela 1.3 – Grupos de micoses e respectivos exemplos (Forbes *et al.*, 2002).

Tipo de micose	Descrição	Infecções
<b>Superficial ou cutânea</b>	Infecções que envolvem o cabelo, pele, ou unhas sem invasão dos tecidos mais profundos.	Tinea negra Piedras (negra e branca) Dermatofitose Candidíase mucocutânea
<b>Subcutânea</b>	Infecções confinadas aos tecidos subcutâneos e ossos sem disseminação para outras partes do corpo.	Cromoblastomicose Micetoma Esporotricose
<b>Sistêmica</b>	Infecções que se disseminam e envolvem um ou mais órgãos internos.	Histoplasmose Paracoccidioomicose Coccidiomicose Blastomicose Candidíase invasiva
<b>Oportunista</b>	Infecções causadas por fungos que normalmente são comensais mas que devido a uma baixa do sistema imunitário acabam por invadir tecidos e provocar infecção.	Aspergilose Criptococose Zigomicose Candidíase

### 1.3. Características gerais dos fungos

Os fungos constituem um grupo de organismos eucariotas que têm parede celular e são desprovidos de clorofila (Kwon-Chung e Benett, 1992). Devido a esta característica, os fungos não tem capacidade de produzir energia através da luz e do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), ou seja, não são capazes de realizar fotossíntese. Apresentam então a característica heterotrófica quimiotrófica, dependendo das substâncias orgânicas previamente formadas. Podendo ser haplóides ou diplóides, reproduzem-se, multiplicando-se de forma vegetativa, assexuada, sexuada ou parassexuada. A dispersão é feita através de esporos e formas vegetativas (Minami, 2003).

Estes organismos podem ser saprófitas, comensais ou parasitas. Como saprófitas, vivem de materiais em decomposição, formando colónias. Habitam em animais, plantas e solos. Os comensais vivem em materiais orgânicos e em hospedeiros animais ou vegetais. Por fim os parasitas vivem dependentes de animais e plantas, causando frequentemente infecções, as micoses, originando lesões de ligeiras a graves, muitas vezes fatais (Minami, 2003).

Os fungos podem apresentar duas formas distintas: leveduras e filamentos, embora estas duas formas não sejam mutuamente exclusivas (figura 1.1). Um fungo pode assumir apenas uma ou ambas as formas sob diferentes condições de crescimento (Kwon-Chung e Benett, 1992). No segundo caso

dá-se o nome de fungo dimórfico. As formas dos fungos dimórficos podem ser dependentes ou independentes da temperatura. Na primeira situação, os fungos termicamente dependentes produzem, em geral, filamentos dos 25°C aos 30°C e, sob certas circunstâncias, apresentam-se sob a forma leveduriforme dos 35°C aos 37°C (Forbes *et al.*, 2002).

As leveduras são organismos unicelulares com forma arredondada e apresentam dimensões entre 2 a 60 µm. Geralmente reproduzem-se assexuadamente por gemulação e sexuadamente pela produção de artrosporos e basidiósporos (Forbes *et al.*, 2002).

Por sua vez, os filamentosos são constituídos por hifas, semelhantes a pequenos tubos. O conjunto destas hifas forma o micélio que penetra no substrato que lhes fornece os nutrientes necessários para o crescimento do fungo, absorvendo-os.

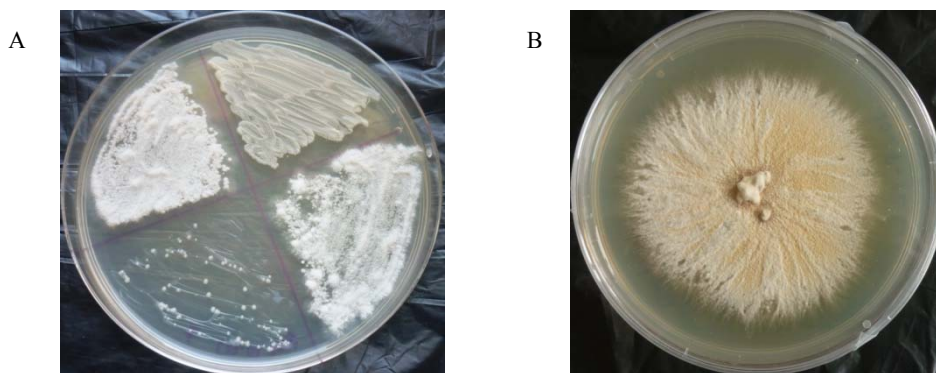


Figura 1.1 – A - Fungos leveduriformes (*Candida* spp.); B - Fungo filamentoso (*Microsporium gypseum*).

Os fungos encontram-se em diversos ambientes (solo, água, atmosfera, plantas, animais e o organismo humano). No entanto, o principal reservatório dos fungos patogénicos para a espécie humana é o solo.

O facto de alguns fungos patogénicos se encontrarem apenas em certas regiões do globo pode ser explicado por factores biológicos (virulência do agente e resistência do hospedeiro), ecológicos (relações entre o agente e o meio ambiente e entre o agente e outros seres vivos) e sociológicos (hábitos de higiene, práticas desportivas, migração, habitação, vestuário, alimentação e distribuição dos agregados populacionais, entre outros) (Carvalho, 2008).

Um dos principais objectivos da epidemiologia é a prevenção da infecção fúngica, pois ainda não existem vacinas eficazes contra estes microrganismos estando apenas disponíveis tratamentos antifúngicos sob a forma de comprimidos, pomadas e óvulos.

#### 1.4. Leveduras de interesse clínico

As leveduras, amplamente distribuídas pela natureza, são fungos unicelulares que crescem sob a forma de células redondas, ovais ou alongadas, ou blastosporos, que se reproduzem por gemulação (Campbell *et al.*, 1996).

O termo pseudohifa ou pseudofilamento é usado para descrever uma cadeia de células leveduriformes que se alongaram após a gemulação, mas que permanecem ligadas umas às outras. Ao contrário de uma verdadeira hifa, a junção entre células adjacentes na pseudohifa aparece, ao microscópio óptico, como uma constrição. No caso das hifas, as células adjacentes estão separadas por septos, não se observando qualquer constrição no ponto de contacto. Em alguns casos estas podem fragmentar-se formando cadeias de células individuais denominadas artrosporos (Campbell *et al.*, 1996).

As leveduras pertencem a uma categoria de fungos saprófitas habitualmente inofensivos. No entanto tem havido uma evolução das patologias fúngicas sendo hoje frequente as candidíases por um elevado número de espécies do género *Candida*, especialmente em indivíduos com o sistema imunitário comprometido (Freitas e Sousa, 2000).

##### 1.4.1. Leveduras do género *Candida*

São várias as espécies do género *Candida* de colonizam a pele e as superfícies das mucosas humanas (Hassan *et al.*, 2009) habitando comensalmente nestes locais. São habitualmente patogénicos oportunistas e podem causar infecções locais ou sistémicas em pessoas predispostas, afectando normalmente pacientes imunocomprometidos, que tenham sido sujeitos a antibioterapia prolongada, quimioterapia ou ainda recém-nascidos (Samaranayake e Hanes, 2011).

De todas as espécies do género *Candida* descritas até agora, *Candida albicans* é a levedura que mais frequentemente causa infecções fúngicas sendo também por isso a mais estudada. Esta é igualmente o principal agente etiológico da candidíase vulvovaginal, uma patologia comum que afecta mulheres na idade fértil e que frequentemente se torna numa doença crónica, ou de cura muito difícil (Pietrella *et al.*, 2011).

##### *Ecologia e epidemiologia*

As leveduras do género *Candida* estão amplamente distribuídas, podendo ser encontradas em plantas, no tracto intestinal dos animais ou como organismos comensais nas membranas mucocutâneas do ser humano (Scorzoni *et al.*, 2007).

A natureza do hospedeiro determina o momento em que estas leveduras deixam de ser comensais e passam a ser patogénicas, invadindo os tecidos e causando infecção. Enquanto o sistema



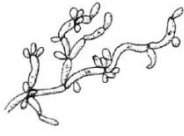
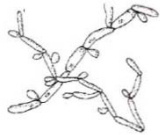
imunitário do hospedeiro permanecer activo, completamente funcional, se não ocorrerem alterações na flora normal e a integridade tecidual se mantiver, as leveduras do género *Candida* não conseguem multiplicar-se e invadir os tecidos (Treagan, 2008).

Apesar da fonte da infecção ser na maioria dos casos endógena ao hospedeiro, estas leveduras também podem ser adquiridas através do ambiente. Estudos realizados em hospitais têm demonstrado a presença de *Candida* spp. em ambiente hospitalar, como por exemplo nas bancadas de trabalho, ar-condicionado, chão, respiradouros e alimentos. Foi ainda isolada a partir das mãos e batas dos profissionais do hospital (Treagan, 2008). Por outro lado, devido ao facto de a fonte das candidíases ser maioritariamente endógena, os estudos epidemiológicos têm-se focado em realizar comparações entre a população de leveduras de pacientes doentes e a de indivíduos saudáveis. Têm sido realizados diversos estudos sobre a sua presença na flora da boca, recto, vagina e pele (Faria, 2007).

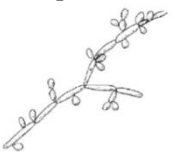
Têm sido várias as espécies isoladas de casos de candidíase (tabela 1.4): *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. inconspícua*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. pelliculosa*, *C. nivariensis*, *C. bracarensis*, entre outras mais raras.

Na seguinte tabela apresentam-se as características das espécies que mais frequentemente causam infecções:

Tabela 1.4 – Características morfológicas microscópicas com respectivas ilustrações e características e macroscópicas de algumas espécies patogénicas de *Candida*. (Ellis, 2012; Larone, 2002, Kwon-Chung e Benett, 1992)

Espécie	Morfologia microscópica	Morfologia macroscópica (meio de Sabouraud)
<b><i>Candida albicans</i></b> 	Células leveduriformes que variam entre forma esférica e alongada, possuindo vários tamanhos. Produzem blastosporos, hifas, pseudohifas e clamidósporos.	Colónias de cor branca a creme, possuindo uma aparência lisa e brilhante.
<b><i>Candida glabrata</i></b> 	Células leveduriformes ovais. Não produzem hifas nem pseudohifas e, ao contrário de <i>C. albicans</i> , são leveduras haplóides.	Colónias de cor creme, possuindo uma aparência lisa, glabra e acetinada.
<b><i>Candida lusitaniae</i></b> 	Células ovais ou elípticas. Podem produzir pseudohifas.	As colónias podem variar entre o branco e o creme, possuindo aparência brilhante, lisa e suave.
<b><i>Candida parapsilosis</i></b> 	Células leveduriformes variam entre a forma elíptica, alongada e oval. Produzem blastosporos e pseudohifas.	Colónias morfológicamente semelhantes às de <i>C. albicans</i> não sendo possível distingui-las macroscopicamente. Por vezes podem apresentar aspecto mais granuloso ou enrugado.

(Continuação da tabela 1.4)

<b><i>Candida tropicalis</i></b> 	Células leveduriformes globulares, ovais ou alongadas. Produção de blastosporos.	As colónias podem variar entre o branco e o creme, possuindo aparência brilhante mais baça, lisa, suave ou enrugada. Pode-se visualizar a formação de micélio no bordo de culturas antigas.
---	--	---

Em 2001 Tietz *et al.* encontram vários isolados de *C. albicans* com fenótipo não usual. Normalmente, utilizando a identificação convencional, *C. albicans* forma tubo germinativo e produz clamidósporos em *corn-meal agar*. Mas neste estudo verificaram que estes isolados provenientes principalmente de pacientes de Angola e Madagáscar, apresentavam tubo germinativo mas não ocorria a produção de clamidósporos. Assim Tietz *et al.* denominou esta levedura como *Candida africana* como sendo uma nova espécie ou uma variante da *C. albicans*.

Através do diagnóstico presuntivo era possível distinguir *C. africana* de *C. albicans* pois esta não produz clamidósporos e em termos bioquímicos apresenta um perfil de assimilação de carboidratos atípico (não assimila N-acetilglucosamina, glucosamina, trealose DL-lactato) (Gumral *et al.*, 2011; Nnadi *et al.*, 2012). Mas através de técnicas moleculares não era possível distinguir *C. africana* de *C. albicans* pois apresentam um elevado grau de similaridade (Alonso-Vargas *et al.*, 2008).

Apenas em 2008 Romeo e Criseo descreveram o primeiro método molecular que distinguia *C. albicans* de *C. africana* baseando-se numa técnica que distinguia *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Esta técnica amplifica o gene *Hyphal Wall Protein 1 (HWP1)*, um dos responsáveis pela virulência das estirpes relacionadas com candidíases sistêmicas, altamente induzido aquando a formação do tubo germinativo (Romeo *et al.*, 2006; Romeo e Criseo, 2008). O *HWP1* codifica uma proteína de superfície da membrana fúngica, a Hyphal Wall Protein 1 (HWP1), que serve como substrato para a transglutaminase dos mamíferos permitindo assim a ligação da levedura às células epiteliais (Romeo *et al.*, 2006).

Segundo a literatura esta levedura parece estar mais associada a infecções vaginais (Romeo e Criseo, 2008; Alonso-Vargas *et al.*, 2008; Gumral *et al.*, 2011; Nnadi *et al.*, 2012), mas até ao momento ainda existem muito poucos estudos sobre este microrganismo.

### *Distribuição geográfica*

As leveduras do género *Candida* apresentam uma distribuição mundial. São vários os casos reportados de candidíase em todo o mundo. Porém, em Portugal, os dados epidemiológicos são escassos, especialmente no que toca ao estudo da incidência de *Candida* sp. em infecções fúngicas vaginais. No entanto, um estudo epidemiológico sobre candidíase invasiva num hospital do Porto revelou uma incidência de dois casos por cada 1000 admissões hospitalares, associadas a uma mortalidade elevada (39,3%) (Sabino *et al.*, 2011).

Quanto a Cabo-Verde a frequência de casos de infecções fúngicas observadas nos hospitais é muito elevada apesar de ainda não existir qualquer estudo realizado no âmbito da micologia, mais concretamente no estudo de infecções fúngicas vaginais. Assim este trabalho é pioneiro na área, neste país.

### *Patogenicidade*

São diversos os factores de virulência que as leveduras do género *Candida* apresentam:

- Adesinas: São glicoproteínas localizadas na superfície da parede celular. Estas medeiam as interações com as outras células e têm um importante papel no *mating*, nas alterações morfológicas das colónias e na formação de biofilmes. São também muito importantes nos estágios iniciais de uma infecção (Treagan, 2008).

O processo de adesão pode ser influenciado por factores externos, nomeadamente a elevada concentração de açúcares, que aumenta a adesividade das leveduras do género *Candida* às células dos tecidos (Treagan, 2008). A presença de sacarose, glucose e frutose no ambiente onde se encontra a levedura é determinante na promoção da adesão às células do hospedeiro. Este factor tem uma importância clínica muito importante (Treagan, 2008), permitindo explicar, por exemplo, o facto de os indivíduos diabéticos serem mais propensos a sofrer episódios de candidíase.

- Receptores Integrina: São proteínas de membrana do plasma que participam em diversas funções. As espécies de *Candida* possuem proteínas integrina com semelhanças antigénicas e funcionais aos receptores 3 e 4 do complemento nos humanos. É possível que algumas destas proteínas fúngicas medeiam a aderência das leveduras às células humanas (Treagan, 2008).

- Interações não-específicas: Ocorrem interações não específicas entre a superfície das leveduras e as células hospedeiras através de forças hidrofóbicas e electrostáticas que facilitam a adesão às células do hospedeiro (Treagan, 2008).

- Enzimas proteolíticas: Estas enzimas, proteases e fosfolipases, que tem uma função de degradação são importantes na invasão dos tecidos (Treagan, 2008).

- Dimorfismo: A capacidade para formar pseudohifas apresenta um importante papel na patogenicidade das leveduras do género *Candida*, pois estas pseudohifas facilitam a aderência das leveduras às superfícies epiteliais das células hospedeiras. Assim, a conversão da forma leveduriforme para a forma filamentosa permite a penetração e invasão dos tecidos pelas leveduras (Treagan, 2008).

- Formação de biofilme: O contacto com as superfícies permite a formação de biofilmes por parte de *Candida* spp. *C. albicans*, sendo geralmente mais patogénica que as outras espécies de



*Candida*, produz substancialmente mais biofilme *in vitro* do que os isolados *C. não-albicans* (Treagan, 2008).

- *Switching*: A maioria das espécies do género *Candida* é capaz de efectuar *switching* espontâneo, reversível com uma elevada frequência entre um número de fenótipos distinguíveis através da morfologia das colónias (Prata, 2007). Este processo altera a expressão da superfície das células antigénicas, a afinidade em relação aos tecidos do organismo, a produção de enzimas e também a sensibilidade aos antifúngicos (Ferreira, 2008).

### *Manifestações clínicas*

A candidíase, doença provocada pelas leveduras do género *Candida* desenvolve-se, em geral, nas mucosas, no tecido cutâneo, nas unhas e, mais raramente, produzindo lesões sistémicas nos pulmões, rins, coração, sistema nervoso central e outros órgãos após disseminação hematogénica. Nas mucosas, provoca lesões esbranquiçadas como grumos de leite, os chamados “sapinhos”, que se observam muitas vezes nos recém-nascidos (Minami, 2003).

Verifica-se a incidência da candidíase em ambos os sexos e em todas as idades e raças. A incidência desta infecção aumentou com o uso alargado de antibióticos, imunossuppressores, agentes terapêuticos que deprimem o sistema imunitário (Minami, 2003) passando as leveduras do género *Candida* a comportarem-se como patogénicas oportunistas.

Doenças como o VIH ou tratamentos que levam à imunodepressão, bem como a implantação de cateteres intravenosos podem contribuir para o aparecimento de candidíase. Pacientes com neutropenia, doenças hematológicas malignas, queimaduras, ou toxicodependentes estão também predispostos a esta infecção (Faria, 2007).

A candidíase vulvovaginal afecta milhões de mulheres em cada ano, por todo o mundo, sendo a causa mais comum de vaginite aguda na Europa, Estados Unidos e em certos países tropicais (Paiva *et al.*, 2012). Foi descrita pela primeira vez por J. S. Wilkinson em 1949 ao estabelecer uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginites (Barbedo e Sgarbi, 2010).

Estima-se que 75% das mulheres adultas já sofreram um episódio de candidíase vulvovaginal e que 5% sofrem de episódios recorrentes (Fidel, 2006; Chong *et al.*, 2007; Barbedo e Sgarbi, 2010; Rad *et al.*, 2011; Paiva *et al.*, 2012).

A candidíase não é uma doença recente. Data desde o século 4 d.C., quando Hipócrates no seu livro *Epidemics*, descreveu aftas orais em dois pacientes em estado avançado de doença. Em 1771 Rosen von Rosenstein e Underwood identificaram essas aftas em crianças e descreveram a infecção em livros sobre pediatria. Em 1835, Véron descreveu um caso de candidíase esofágica e postulou que



os recém-nascidos adquiriam esta doença durante a passagem através da vagina. Várias outras descrições foram feitas até que em 1986 iniciaram-se os estudos genéticos e moleculares com *C. albicans* após o sucesso na clonagem e transformação de mutantes do gene *ADE2* por Kurtz *et al.* (Kwon-Chung e Benett, 1992).

Apesar de *C. albicans*, ser a espécie mais frequentemente associada a candidíases, tem-se verificado, nestes últimos anos, a emergência de outras espécies de *Candida* com particular aumento na frequência de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Arancia *et al.*, 2009), passando a ser identificadas como agentes etiológicos de candidíases (Panizo *et al.*, 2009).

Mais especificamente, *Candida glabrata* é neste momento a segunda causa de candidíase vulvovaginal. Considerada como saprófita e não patogénica na microbiota normal de indivíduos saudáveis, nas últimas duas décadas, como consequência das causas anteriormente descritas, os casos de infecções provocadas por esta espécie têm vindo a aumentar significativamente (Barbedo e Sgarbi, 2010).

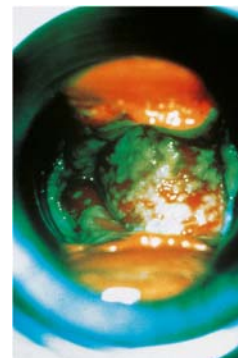


Figura 1.2 – Candidíase vaginal (Sobel, 2010).

Os factores predisponentes ao aparecimento de candidíase vaginal (figura 1.2) são variados. Por um lado verifica-se uma maior incidência em mulheres grávidas do que mulheres não grávidas (Sobel 2007; Sobel 2010).

A utilização de antibióticos de largo espectro, especialmente antibióticos vaginais e sistémicos, também pode levar ao aparecimento desta infecção pois causam desequilíbrio na flora vaginal devido à eliminação da flora bacteriana protectora (Sobel 2007; Sobel 2010).

Diabetes *Mellitus* é outro factor muito importante, verificando-se uma maior incidência desta infecção em indivíduos portadores (Sobel 2007; Sobel 2010).

Os contraceptivos têm sido considerados como um factor que pode levar ao aparecimento da candidíase vulvovaginal, embora os dados em relação a este factor ainda sejam um pouco contraditórios. Há estudos que relacionam o uso de contraceptivos orais com altas concentrações de estrogénio levando ao aumento da colonização de *Candida* sp. Por outro lado têm sido também apresentados estudos com mulheres que utilizam contraceptivos orais com baixas concentrações de estrogénio e que apresentam igualmente candidíase. O uso de dispositivos intrauterinos, diafragmas, preservativos, com ou sem espermicida, também pode levar ao aparecimento de candidíase (Sobel, 2007; Sobel, 2010).

Por outro lado, a genética também pode influenciar o aparecimento de candidíase. Recentemente, estudos sobre os polimorfismos *in vitro* envolvendo a ligação da lectina à manose e a

indução de vaginite em ratinhos sugere que alguns indivíduos podem ter uma susceptibilidade genética para esta doença (Sobel, 2007).

Tal como para as outras manifestações clínicas, a infecção VIH e os tratamentos que levam à imunossupressão também contribuem para o aparecimento da infecção vaginal por *Candida*.

Relativamente às fontes de infecção, o intestino pode servir como reservatório natural bem como o lúmen vaginal, o que leva à possibilidade de transmissão sexual. É natural a existência de quantidades ínfimas de leveduras não detectáveis pelos métodos convencionais de identificação, que rapidamente proliferam quando as condições se tornam favoráveis (Sobel, 2007).

Podem ser diversos os sintomas provocados pelo aparecimento da infecção embora tenha de se ter sempre presente que não são exclusivos de candidíase, podendo ser também característicos de outras infecções vaginais. Apenas o aparecimento de leucorreia branca, espessa e abundante é considerada pelos profissionais de saúde como característica da presença de *Candida* sp. Na tabela 1.5 apresenta-se os factores predisponentes e sintomas clínicos mais comuns associados a esta doença.

Tabela 1.5 – Aspectos clínicos da candidíase vaginal: factores predisponentes e sintomatologia (Sobel, 2007; Sobel, 2010).

<b>Factores predisponentes</b>	<b>Sintomatologia</b>
Contraceptivos orais com estrogénio	Dispareunia
Diabetes <i>Mellitus</i>	Disúria
Gravidez	Dor
Infecção por VIH	Irritação vaginal
Predisposição genética	Lesões pustulopapular periféricas e discretas na vulva e lábios
Terapia com antibióticos	Leucorreia branca e espessa
Terapia corticosteroide	Odor
Uso de dispositivos intrauterinos, diafragmas e preservativos	Prurido
Uso de roupas sintéticas e apertadas (Provavelmente)	Queimadura vulvar

### 1.5. O diagnóstico laboratorial da candidíase vaginal

O diagnóstico micológico é geralmente um processo difícil e complexo que envolve um grande número de critérios e, para esses critérios serem verificados, é necessária a concretização de vários testes. Infelizmente, em muitas instituições apenas são usados critérios clínicos, o que não permite um correcto diagnóstico pois os quadros clínicos das infecções fúngicas podem ser semelhantes aos de outras doenças, levando a abordagens e tratamento inadequados (Arancia *et al.*, 2009).

Sendo assim é da máxima importância que os procedimentos utilizados no seu diagnóstico incluam, não só as manifestações clínicas, mas também a identificação convencional e a detecção molecular dos fungos.

### 1.5.1. Identificação convencional de leveduras em Micologia Médica

Os métodos de identificação convencional são bem conhecidos e utilizados há muitos anos, estão amplamente otimizados e são considerados *standard* no diagnóstico em micologia. Incluem o exame microscópico directo para a observação das estruturas fúngicas tal como estão a parasitar o hospedeiro. Em certos casos, nomeadamente nas candidíases vulvovaginais, de acordo com o actual guia dos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), se estivermos perante um caso de sintomatologia clínica compatível com candidíase, em que a doente tem um pH vaginal normal e cujo exame directo tenha demonstrado a presença de estruturas fúngicas, a cultura já não é requerida (Dan *et al.*, 2010).

O exame de cultura é o único que permite isolar e identificar a espécie de fungo que está a causar infecção, através do crescimento das colónias nos diferentes meios de cultura. Os meios devem permitir o desenvolvimento de todo e qualquer fungo que exista na amostra clínica. O meio de Sabouraud é o mais utilizado em Micologia Médica, mas, quando se justifica podem-se utilizar outros, como gelose sangue, *Sabouraud-BHI agar*, *inhibitory mold agar*, *yeast extract phosphate*, entre outros, em função do objectivo pretendido (Kwon-Chung e Benett, 1992).

Ao meio seleccionado devem ser adicionados compostos que melhorem o isolamento dos fungos patogénicos (Ferreira, 2008), como por exemplo, a gentamicina e cloranfenicol, que impedem o crescimento de bactérias existentes nas amostras biológicas. A cicloheximida que inibe o crescimento de fungos saprófitas, também inibe algumas espécies de leveduras pelo que não deverá ser utilizado no diagnóstico de candidíases. Depois de realizado o isolamento é necessário proceder à identificação da espécie. Para isso recorre-se à observação de características morfológicas e fisiológicas.

#### *Características morfológicas*

As características morfológicas são variadas desde a aparência e cor das colónias quando crescidas num determinado meio, a forma e dimensão das células e a produção de hifas e pseudohifas. Contudo, no caso específico das leveduras do género *Candida*, as diferenças morfológicas não são suficientes para permitir a identificação da espécie.

#### *Características fisiológicas*

As propriedades fisiológicas permitem diferenciar e identificar as diferentes espécies de leveduras, com base na capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono por via oxidativa, fermentativa ou ambas; na capacidade de utilização de compostos azotados, nomeadamente de nitratos

como única fonte de azoto e de exigências nutritivas específicas como a necessidade de vitaminas e a resistência à cicloheximida (actidiona) (Freitas e Sousa, 2000).

A prova do tubo germinativo ou Teste da Blastese é um teste rápido e económico que permite a diferenciação entre a *Candida albicans* e as espécies não-*albicans*. Mas também apresenta algumas limitações: Por um lado não permite distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis* pois ambas dão resultados semelhantes nas mesmas condições (Pincus *et al.*, 2007). Por outro lado, sabe-se que 5 % dos isolados de *C. albicans* não formam tubo germinativo recorrendo-se então, por exemplo, a testes bioquímicos ou moleculares para a sua identificação.

O teste Bichrolatex *albicans*<sup>®</sup> constitui uma boa alternativa para identificação de *C. albicans*. É um método muito rápido que permite a identificação de *Candida albicans* e apresenta-se mais fiável que o Teste da Blastese. Este método baseia-se numa reacção de aglutinação entre partículas de látex revestidas com um anticorpo monoclonal específico e um antigénio da parede de *Candida albicans*. Estas partículas reconhecem as células desta espécie, aglutinando-as de tal forma que é possível a sua fácil visualização.

Os testes bioquímicos avaliam a capacidade de um fungo assimilar certos compostos e existem actualmente comercializados vários sistemas de identificação padronizados como o ID32C<sup>®</sup>, VITEK<sup>®</sup> (bioMérieux) e WalkAway<sup>®</sup> (Baxter Diagnostic, Inc., WestSacramento, California).

Como alternativa mais económica e rápida existem ainda meios cromogénicos de diversos tipos: *Candida diagnostic agar (CDA)*, *Candida ID*, *CandiSelect* e *CHROMagar Candida* (Pincus *et al.*, 2007) que permitem aligeirar o tempo de espera para diagnóstico. São muito utilizados em meio hospitalar, nomeadamente em Portugal, embora apresentem a grande desvantagem de serem pouco específicos.

### 1.5.2. Métodos de identificação moleculares

Para o tratamento das candidíases é muito importante que se identifique a espécie pois a susceptibilidade aos vários tipos de fármacos varia com as espécies. Enquanto as técnicas convencionais apenas permitem a identificação de um isolado de cada vez, tornando o diagnóstico mais lento, as técnicas moleculares permitem a identificação de vários isolados em simultâneo com resultados mais precisos e rápidos.

São variadas as técnicas utilizadas actualmente: reacção de *Polymerase Chain Reaction (PCR)* com *primers* específicos, *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, do *fingerprinting* de regiões mini – e micro-satélite (MS-PCR), *Multilocus sequence typing*, *Panfungal Loop-Mediated Isothermal DNA*, sequenciação de regiões específicas, entre outros (Odds e Jacobsen, 2008; Inácio *et al.*, 2008; Zalar *et al.*, 2011).

Nesta introdução serão referidos mais detalhadamente os métodos utilizados neste trabalho, tendo sido escolhidos pela sua simplicidade, sensibilidade e maior rapidez de execução, exigências adequadas à sua aplicabilidade em laboratórios hospitalares.

As técnicas de diagnóstico baseadas na amplificação de ácidos nucleicos, incluindo o PCR estão a ser fortemente usadas em práticas clínicas (Elías *et al.*, 2012).

O PCR multiplex é uma técnica de identificação molecular rápida e eficaz de microrganismos que tem sido utilizada em diversas áreas, desde bacteriologia à virologia, passando pela micologia. Utilizando um conjunto de *primers* específicos para cada uma das espécies a identificar, possibilita numa única reacção de PCR a identificação das principais espécies clinicamente importantes, nomeadamente *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Esta metodologia baseia-se na amplificação de fragmentos específicos de DNA, nomeadamente das regiões *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS1) e *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2), combinando dois *primers* universais para leveduras e um *primer* específico para cada espécie do género *Candida*, e dá origem, na mesma reacção de PCR a dois produtos de amplificação de diferentes pesos moleculares para cada espécie (Carvalho *et al.*, 2007). Outro factor importante que permite facilitar muito o trabalho e o tempo de diagnóstico é que este método não exige a extracção previa do DNA da levedura e podem-se utilizar directamente células a partir de colónias crescidas em meios de cultura o que possibilita detectar directamente infecções mistas a partir de uma determinada amostra biológica. Assim, a reacção de PCR multiplex sendo simples e fiável parece ter os requisitos necessários para que, ao nível da clínica e da epidemiologia, se torne num método útil na detecção e identificação das espécies de maior importância clínica do género *Candida* (Ferreira, 2008).

O PCR-RFLP é um método rápido e simples de executar, requerendo apenas equipamento comum de Biologia Molecular e fornece resultados facilmente reproduzíveis, sendo facilmente adaptável à maioria dos laboratórios de diagnóstico (Mirhendi *et al.*, 2005; Mirhendi *et al.*, 2006).

Esta técnica tem sido utilizada na tipagem de diferentes microrganismos e baseia-se na hidrólise do DNA por enzimas de restrição e posterior separação electroforética dos fragmentos gerados que correspondem a padrões de restrição específicos para cada espécie ou estirpe, consoante a enzima utilizada.

Têm sido sugeridas diferentes regiões-alvo para a amplificação de regiões do genoma de espécies do género *Candida* passíveis de permitir a identificação por PCR-RFLP. O genoma possui uma vasta complexidade e muitos genes têm-se mostrado úteis para inferir relações filogenéticas. O melhor exemplo da ampla utilização de genes nucleares em estudos filogenéticos é a unidade de

repetição do DNA ribossômico (rDNA), a qual tem sequências intercalares que variam dentro e entre populações e sequências codificadoras que são altamente conservadas, que podem servir como marcadores para comparação entre diferentes taxonomias (Reiss e Odds, 1998).

Os genes ribossômicos têm sido alvos muito utilizados em sistemas de detecção por PCR e na identificação de fungos patogénicos (Kappe e Muller, 1998; Reiss e Odds, 1998), mas a identificação de diferentes estirpes torna-se difícil devido à pouca variação entre as espécies de leveduras ao nível das subunidades 18S e 28S rDNA (Einsele *et al.*, 1997; Kappe e Muller, 1998; Reiss e Odds, 1998). Pelo contrário, as regiões ITS1 e ITS2 são, sequências altamente variáveis e têm sido usadas na identificação diferentes espécies de fungos (Einsele *et al.*, 1997, Reiss e Odds, 1998).

### 1.6. Antifúngicos

O número de casos de infecções fúngicas humanas tem vindo a aumentar nos últimos anos e, como resposta, tem-se verificado a introdução de novos fármacos antifúngicos no mercado. Infelizmente a sua actuação nem sempre é eficaz e os efeitos secundários são agressivos, para além desta área se encontrar muito menos desenvolvida que a dos antibióticos antibacterianos.

No tratamento das infecções fúngicas humanas é essencial que, primeiramente, seja feita uma avaliação para a escolha do melhor antifúngico a ser usado. Se por um lado, tanto os fungos como o ser humano são seres eucariotas com muitas semelhanças metabólicas dificultando uma terapêutica não tóxica, por outro lado, diferentes espécies fúngicas, nomeadamente as do género *Candida*, apresentam diferentes susceptibilidades aos antifúngicos (*C. glabrata* e *C. krusei* são naturalmente resistentes ao fluconazol). Um antifúngico ideal deverá apresentar as seguintes características (Sobel *et al.*, 1998):

- ◆ Fácil administração, favorecendo a adesão à terapêutica;
- ◆ Eficácia numa terapêutica de curta duração;
- ◆ Efeito fungicida;
- ◆ Promoção do alívio imediato dos sintomas;
- ◆ Ausência de efeitos secundários locais e sistémicos;
- ◆ Segurança para a administração na gravidez;
- ◆ Prevenção de infecções recorrentes;
- ◆ Não provocar alterações na flora endógena;
- ◆ Baixo custo;
- ◆ Largo espectro de acção.

De modo a diminuir os danos provocados pelos fármacos nas células humanas, muitos antifúngicos têm como alvo o ergosterol que apenas existe na membrana das células fúngicas.

### 1.6.1. Antifúngicos convencionais

Os principais antifúngicos usados no tratamento de micoses humanas actuam a nível da membrana plasmática dos fungos, da biossíntese do ergosterol, da síntese dos ácidos nucleicos e da integridade da parede celular, dividindo-se em polienos, azóis, alilaminas e tiocarbamatos, análogos de nucleósidos e equinocandinas. Nesta introdução apenas serão abordados os azóis.

#### *Azóis*

Os azóis são o maior grupo de antifúngicos comercialmente disponíveis neste momento. Os primeiros compostos a aparecerem foram os imidazóis (cetoconazol, clotrimazol e miconazol) que actualmente apenas são usados no tratamento de micoses superficiais porque têm um uso limitado em micoses invasivas (Sanglard *et al.*, 2009; Marie e White, 2009). Seguiram-se os triazóis de primeira geração, fluconazol e itraconazol, mais activos no tratamento tanto de micoses superficiais como de invasivas e, mais recentemente, a segunda geração de triazóis, o voriconazol e o posaconazol, que possuem espectros de acção ainda mais alargados que os anteriores (Adriole, 1999; Marie e White, 2009).

Os azóis actuam inibindo diversas enzimas envolvidas na síntese do ergosterol. O principal alvo dos azóis nas leveduras do género *Candida* é a enzima 1,4- $\alpha$ -desmetilase do citocromo P-450 (Erg11p), que é codificada pelo gene *ERG11* e está envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol. É neste ponto que os azóis interferem na biossíntese do ergosterol ao interferir no centro activo da enzima alvo, ligando-se ao grupo heme, actuando como inibidor competitivo do substrato (Xu *et al.*, 2008; Sanglard *et al.*, 2009; Marie e White, 2009; Pfaller, 2012). Isto leva ao esgotamento do ergosterol e à acumulação de esteróis precursores, incluindo os esteróis 1,4- $\alpha$ -metilados, resultando na formação de membrana plasmática com estrutura e função alteradas (Faria, 2007).

Tanto o fluconazol como o voriconazol, apresentam boa biodisponibilidade via oral e possuem baixa incidência de efeitos adversos (Gomes, 2012). O clotrimazol ainda é utilizado especialmente em países com menos recursos, como por exemplo Cabo-Verde, pois dentro dos azóis é um antifúngico mais económico.

O fluconazol é um composto metabolicamente estável, solúvel em água, com fraca ligação às proteínas plasmáticas. Pode ser administrado tanto por via oral como por via intravenosa uma vez que ambas possuem uma farmacocinética semelhante. Os níveis de fluconazol no sangue são equilibrados de forma rápida, sendo a droga bem distribuída pelos tecidos. O fluconazol é um antifúngico de largo espectro e é bem tolerado pelo organismo humano possuindo uma incidência muito baixa de efeitos



secundários. É muito recomendado na terapêutica de candidose orofaríngea, esofágica, vaginal e invasiva. É recomendado também o seu uso como profilaxia em doentes neutropénicos. Porém, algumas das limitações mais relevantes do fluconazol incluem a sua inactividade contra fungos filamentosos, a resistência intrínseca de *C. krusei*, a resistência facilmente adquirida em certas espécies de *Candida*, nomeadamente de *C. glabrata*, a sua hepatotoxicidade, a necessidade de ajustes de doses em doentes com deficiência renal e as interferências com outros medicamentos. Como tal, tornou-se necessário desenvolver novas drogas como o voriconazol, um derivado triazólico que possui actividade fungicida de largo espectro contra as espécies de *Candida*, incluindo as estirpes resistentes ao fluconazol (Adriole, 1999; Bagg *et al.*, 2005; Gomes, 2012).

O voriconazol é actualmente uma boa escolha para o tratamento de micoses possuindo a mesma actividade, ou até mesmo superior, que a anfotericina B, com a vantagem de não ser tão hepatotóxico e nefrotóxico e de poder ser administrado por via oral ou parentérica (Bagg *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2005; Gomes, 2012).

### *Resistência aos antifúngicos*

Actualmente tem-se observado um aumento da prevalência de episódios de candidíase em simultâneo com o aumento da utilização dos fármacos antifúngicos acima citados o que pode estar directamente relacionado com o aparecimento de resistências por parte das leveduras aos fármacos.

Como *C. glabrata* e *C. krusei* apresentam uma menor susceptibilidade ao fluconazol tem-se observado um aumento nos índices de colonização e infecção, principalmente por *C. glabrata*, em diferentes grupos de pacientes com exposição prolongada ao fluconazol. Além deste aumento de resistência aos azóis, muitos trabalhos referem igualmente uma menor sensibilidade à anfotericina B. Na verdade, está descrito que podem ocorrer infecções por *C. glabrata* em pacientes previamente sob terapêutica com anfotericina B (Barbedo e Sgarbi, 2010).

As leveduras do género *Candida* têm desenvolvido diversos mecanismos moleculares de resistência, nomeadamente mutações pontuais no gene *ERG11* que provocam alterações conformacionais na Erg11p e, consequentemente, diminuição na ligação por parte dos azóis ao alvo, aumento da expressão do gene *ERG11* e redução da concentração intracelular do fármaco através da actuação de bombas efluxo codificadas pelos genes *CDR1*, *CDR2* e *MDR1* (Ribeiro e Paula, 2007; Manoharlal, 2008; Marie e White, 2009). Está descrito que a resistência pode também estar associada a alterações em outras enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol, alterações cromossómicas, modificação ou degradação do fármaco e reguladores transcricionais. No entanto, outros mecanismos desconhecidos de resistência aos azólicos podem ainda ser encontrados em isolados clínicos (Manoharlal, 2008).



### 1.6.2. Antifúngicos naturais

Tem-se verificado que o número de casos de resistências aos antifúngicos comumente utilizados está a aumentar. Torna-se então necessário encontrar alternativas de tratamento para estes casos e, desde a antiguidade, as plantas medicinais são uma fonte muito conhecida de remédios naturais para o tratamento de várias doenças. De acordo com um relatório realizado pela *World Health Organization* (WHO), são actualmente usadas para fins medicinais 20.000 espécies de plantas (Scorzoni *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais extraídos de plantas têm sido muito usados em aplicações bactericidas, virocidas, fungicidas, antiparasitárias, insecticidas, medicinais e cosméticas desde há muitos séculos, e especialmente hoje em dia são utilizados pela indústria farmacêutica, sanitária, cosmética, alimentar e até na agricultura (Bakkali *et al.*, 2008). Os óleos essenciais são compostos naturais complexos, e voláteis caracterizados por um cheiro intenso e são metabolitos secundários produzidos pelas plantas aromáticas. Na natureza, os óleos essenciais apresentam um importante papel actuando na protecção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, insecticidas e actuando também nos herbívoros, diminuindo o seu apetite na ingestão de plantas (Bakkali *et al.*, 2008).

Até ao momento são conhecidos cerca de 3000 óleos essenciais diferentes, sendo 300 comercialmente importantes especialmente na indústria cosmética, sanitária, alimentar, farmacêutica, agronómica e na perfumaria (Bakkali *et al.*, 2008).

Também o uso de extractos de plantas, como alternativa aos antifúngicos tem sido estudado. Vários grupos de pesquisa têm desenvolvido trabalhos de investigação para estudar as propriedades antifúngicas de plantas usadas na medicina natural, demonstrando actividade biológica dos extractos vegetais (Sati e Joshi, 2011).

De entre os muitos dos óleos essenciais que existem, foram seleccionados para este trabalho, por estudos anteriores terem descrito possuírem acção antifúngica, os óleos essenciais de alecrim, árvore-do-chá e rosmaninho e como extracto, o extracto de grainha de toranja.

#### *Alecrim*

O alecrim cujo nome científico é *Rosmarinus officinalis*, é um pequeno arbusto de folha persistente proveniente da região mediterrânea, crescendo principalmente em encostas rochosas e soalheiras. As propriedades desta planta já são conhecidas há muitos séculos, tendo sido utilizada pelos egípcios, gregos e romanos para fins medicinais. O óleo é obtido por destilação de toda a planta (Willem, 2005). Entre muitas propriedades podem-se destacar (figura 1.3):



Propriedades medicinais

- ◆ Antibacterianas
- ◆ Antifúngicas
- ◆ Antioxidantes
- ◆ Anti-reumáticas
- ◆ Anti-sépticas
- ◆ Reguladoras hepáticas

Figura 1.3 – *Rosmarinus officinalis* e as suas propriedades medicinais

Árvore-do-chá

A árvore-do-chá, de nome científico *Melaleuca alternifolia*, já é utilizada pelos aborígenes australianos há milhares de anos. Oriunda da Austrália, esta planta cresce sob a forma de arbusto atingindo 4 metros de altura. Hoje em dia as propriedades desta planta são mundialmente conhecidas, podemos encontra-la em variados produtos de higiene e também em cosméticos. Já são diversos os estudos científicos realizados para testar as suas propriedades (Cox *et al.*, 2000; Bakkali *et al.*, 2008; Pisseri *et al.*, 2009) (figura 1.4).

Propriedades medicinais

- ◆ Antibacterianas
- ◆ Antifúngicas
- ◆ Anti-parasitárias
- ◆ Anti-sépticas
- ◆ Antivirais
- ◆ Imunoestimulantes



Figura 1.4 – *Melaleuca alternifolia* e as suas propriedades medicinais.

### *Rosmaninho*

O rosmaninho é um pequeno arbusto lenhoso com um aroma muito característico. Possui espigas violetas, geralmente pequenas (2 a 8 cm), compostas por pequenas flores tubulares e labiadas (Bingre, 2005), podendo ser encontrado por quase todo o nosso país. Possui diversas propriedades medicinais que são apresentadas na figura 1.5 (Altiec, 2012).

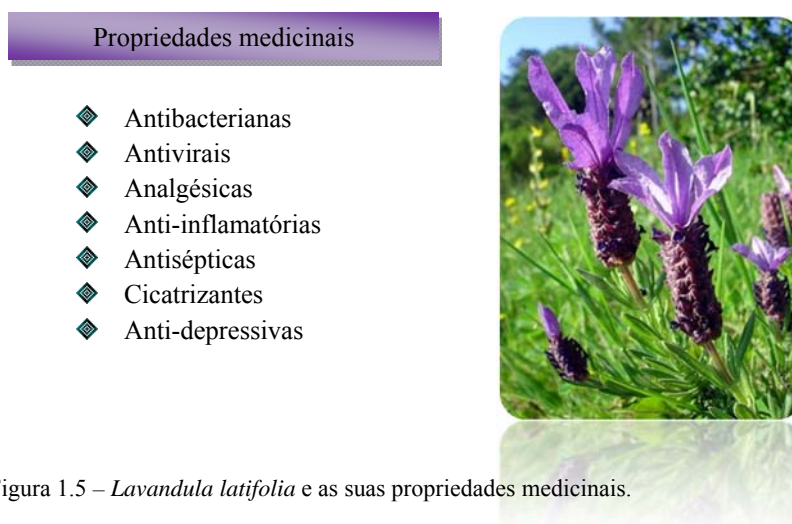


Figura 1.5 – *Lavandula latifolia* e as suas propriedades medicinais.

### *Extracto de grainha de toranja*

A toranja é um fruto que possui muitos nutrientes entre eles a vitamina C, potássio e fibras (The Harvard Medical School, 2006). Tanto as propriedades do sumo como do extracto de grainha desta fruta têm vindo a ser alvo de muitos estudos. Dembinski *et al.* em 2004 fizeram um estudo sobre o papel do extracto de grainha de toranja sobre a sua acção na pancreatite aguda em ratos. Também no mesmo ano Cvetni e Vladimir-Knežević testaram a acção do extracto de grainha de toranja no desenvolvimento de várias espécies de bactérias e fungos. Em 2009 Ha *et al.* testaram este composto contra patogénicos da pele. Recentemente (2012) Yin *et al.* verificaram que o sumo de toranja e os seus constituintes aumentavam o efeito de baixos valores de pH na inibição da sobrevivência e aderência de um serovar de *Salmonella enterica* às células epiteliais do intestino. O extracto de grainha de toranja apresenta as seguintes propriedades (figura 1.6):

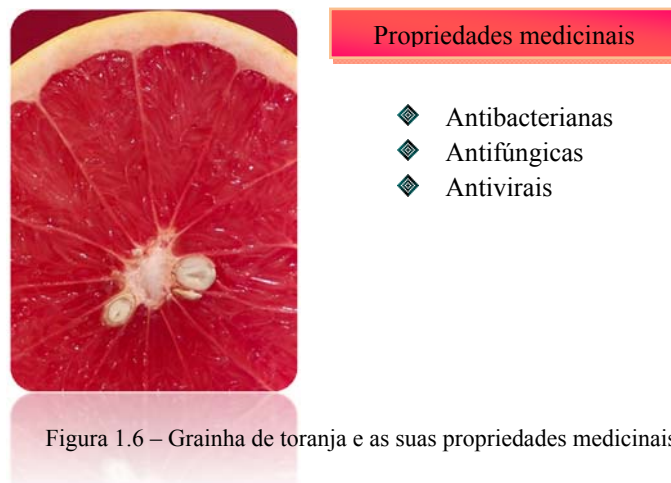


Figura 1.6 – Grainha de toranja e as suas propriedades medicinais.

### 1.6.3. Susceptibilidade aos antifúngicos convencionais e naturais

Actualmente, a pesquisa realizada na área da sensibilidade aos antifúngicos encontra-se muito menos desenvolvida quando comparada à dos antibióticos e por esta razão torna-se urgente o seu estudo. Para além da realização de estudos epidemiológicos, os testes de sensibilidade aos antifúngicos são realmente importantes para pesquisar novas terapêuticas mais eficazes ou para a aplicação de novas drogas em substituição de outras que se tornaram entretanto pouco activas. Assim, a determinação da sensibilidade aos antifúngicos *in vitro* é efectuada de acordo com comportamento das leveduras, quando estas crescem em contacto com o fármaco (Gomes, 2012).

Existem vários métodos para a realização destes testes e por isso, com o intuito de uniformizar as metodologias usadas, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards ou NCCLS) estabeleceu um conjunto de procedimentos padrão para os testes de sensibilidade aos fármacos, no que diz respeito à temperatura e tempo de incubação, à dimensão do inóculo, ao meio de cultura e ao tempo actuação do antifúngico. Estes factores são importantes uma vez que o aumento da concentração do inóculo, o aumento do tempo e da temperatura de incubação, e um meio de cultura com um pH baixo, podem levar ao aumento da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e, consequentemente, a resultados discrepantes, não comparáveis. A Norma desenvolvida pelo CLSI define o conceito de CMI como sendo “a mais baixa concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo em meio sólido com agar ou numa diluição feita em meio líquido” (Gomes, 2012), em condições restritas padronizadas.

O método Kirby-Bauer é um método de difusão que utiliza discos impregnados com o antifúngico que se quer testar de forma a determinar a susceptibilidade ou a resistência do microrganismo em estudo. Após a incubação do fungo nas condições adequadas, é possível verificar

se a estirpe em estudo é Sensível (S), Resistente (R) ou apresenta uma sensibilidade dependente da dose (SDD) em relação ao antifúngico testado. A susceptibilidade é verificada pelo aparecimento de um halo em redor do disco, denominado zona de inibição, que corresponde à ausência de crescimento da levedura. O diâmetro do halo é expresso em milímetros (mm) e, quando comparado com os valores de tabelas já existentes, define-se se a estirpe é S, R ou SDD (Pereira, 2010; Gomes, 2012).

Outro método de avaliação das susceptibilidades, mais preciso mas também muito mais trabalhoso e dispendioso, é o método de diluição em meio líquido. A metodologia foi descrita no documento inicial M27-A (NCCLS 1997), actualmente revisto para o M27-A3 (CLSI 2008), e tornou possível a reprodutibilidade e comparação das susceptibilidades entre agentes antifúngicos de leveduras patogénicas e entre laboratórios, sendo este o método de referência mais utilizado em todo o mundo. Este método baseia-se na exposição de leveduras a uma série de soluções de concentrações crescentes de um antifúngico preparado meio de cultura líquido, o RPMI. Este método pode ser feito recorrendo a macrodiluições ou a microdiluições do antifúngico no meio de cultura. Uma das evoluções que este método sofreu foi precisamente a passagem da utilização de macrodiluições para microdiluições, em que o volume necessário de amostra é menor, permitindo a utilização de placas de cultura celular e a análise de um maior número de amostras em cada ensaio (Cardoso, 2004).

### **1.7. Objectivos do trabalho realizado e plano da dissertação**

As leveduras do género *Candida* fazem parte da flora microbiana endógena da pele, mucosas e do tracto gastrointestinal do Homem. Contudo podem provocar infecções oportunistas, as candidíases. Estas são das infecções fúngicas humanas mais frequentes e apresentam um espectro muito variado. A candidíase vulvovaginal é uma das infecções mais comuns do tracto genital feminino.

Existem várias espécies de *Candida* patogénicas para o ser humano. Estudos epidemiológicos indicam que *C. albicans* continua a ser o agente etiológico da candidíase mais frequentemente isolado. Contudo tem-se observado um aumento significativo da prevalência de infecções provocadas por outras espécies do género *Candida*, inclusive *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, entre outras espécies.

Sabe-se que as diferentes espécies de leveduras do género *Candida* têm diferenças intrínsecas no que se refere à susceptibilidade *in vitro* ao fluconazol, um dos antifúngicos mais utilizados no tratamento das infecções. *C. krusei* tem uma resistência intrínseca ao fluconazol, enquanto que *C. glabrata* se encontra no limiar entre a resistência e a susceptibilidade, adquirindo com facilidade resistência a este fármaco, principalmente se este é administrado em doses mais baixas.

O tratamento dessa patologia nem sempre é fácil e eficaz, frequentemente devido à falta de diagnóstico laboratorial com vista à adequação do tratamento à espécie causadora da infecção, evoluindo em muitos casos para infecções recorrentes. Neste trabalho propõe-se o estudo de casos de candidíase vulvovaginal tanto da região de Lisboa, como da região da cidade da Praia, Cabo Verde, que incluirá o diagnóstico laboratorial da espécie responsável pela infecção, o estudo da sensibilidade *in vitro* aos fármacos mais utilizados no tratamento destas infecções, bem como a existência de padrões genéticos relacionados com a resistência das leveduras aos mesmos.

Em Cabo Verde nunca foi realizado estudo algum sobre a ocorrência de candidíases vaginais, nomeadamente no que diz respeito à sua etiologia e epidemiologia. Pretendeu-se deste modo estudar a ocorrência destas infecções em mulheres residentes no Concelho da Praia, ilha de Santiago e comparar os resultados obtidos com os de mulheres residentes na região da cidade de Lisboa.

Assim este projecto tem como objectivos:

- Testar métodos de detecção e identificação rápida e específica de diferentes espécies de leveduras de interesse médico do género *Candida* presentes em amostras clínicas de exsudados vulvovaginais: *C. albicans*, a espécie patogénica oportunista mais frequentemente isolada, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, e outras consideradas relevantes.

- Comparar as estirpes isoladas das amostras biológicas recolhidas em Cabo-Verde e em Portugal sob o ponto de vista molecular e de resistência aos fármacos mais utilizados no tratamento destas infecções fúngicas.

- Pesquisar *Candida africana* em isolados clínicos provenientes de Cabo-Verde.

- Identificar possíveis diferenças no gene *ERG11*, um dos genes associados à resistência aos fármacos, entre estirpes de *Candida albicans* de Cabo-Verde e Portugal, resistentes e susceptíveis aos fármacos utilizados no estudo.

- Determinar a sensibilidade *in vitro* de alguns isolados clínicos a três óleos essenciais das plantas medicinais alecrim, árvore-do-chá e rosmaninho e ao extracto de grainha de toranja.

Esta dissertação está dividida em quatro capítulos. No primeiro capítulo é feita uma introdução geral à Micologia, às características gerais dos fungos, às leveduras de interesse clínico, aos métodos que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial das micoses e aos antifúngicos frequentemente utilizados no tratamento de infecções fúngicas. Fala-se ainda na potencialidade dos produtos naturais, nomeadamente óleos essenciais e extractos vegetais, como possíveis antifúngicos alternativos. No segundo capítulo é feita uma descrição dos materiais e métodos utilizados e no terceiro capítulo são

apresentados os resultados obtidos. No quarto capítulo do trabalho são discutidos os resultados obtidos e apresentam-se algumas conclusões e perspectivas futuras com base no trabalho realizado.

## 2 - Materiais e métodos

"Dai-me um ponto de apoio e levantarei o mundo."

Arquimedes, matemático grego

### 2.1. – Origem e colheita dos isolados

Neste trabalho foram estudadas um total de 216 amostras biológicas de exsudados vaginais provenientes do laboratório de Microbiologia da Maternidade Alfredo da Costa, em Lisboa e do Hospital Agostinho Neto e do Centro de Saúde Reprodutiva da Fazenda, na Cidade da Praia, Ilha de Santiago, Cabo-Verde. As amostras foram recolhidas entre Dezembro de 2011 e Abril de 2012 na Maternidade Alfredo da Costa e entre Junho e Julho de 2012 no Hospital Agostinho Neto e no Centro de Saúde Reprodutiva da Fazenda em mulheres que recorreram às três instituições. As amostras biológicas foram recolhidas com zaragatoas esterilizadas e depois colocadas em meio de transporte sendo conservadas a 4°C até ao seu processamento. Idealmente o material deve ser colhido no laboratório para ser imediatamente processado. Mas, caso não seja possível, este deve ser rapidamente enviado para o mesmo, de modo a evitar possíveis contaminações ou perda de viabilidade do produto. Este é um passo muito importante no diagnóstico micológico. É necessário ter também presente que as micoses podem desenvolver-se em qualquer parte do organismo humano e, por isso, é fundamental estabelecer a metodologia de recolha mais apropriada para cada tipo de amostra biológica.

Todas as amostras devem ser transportadas em recipientes esterilizados e processadas o mais rapidamente possível. Se o seu processamento não se realizar até no máximo três horas, as amostras devem ser mantidas a 4°C e nunca devem ser congeladas (Ferreira, 2008). Se se estiver perante um caso de infecção vaginal, não sendo possível realizar o processamento da amostra após o momento da recolha, dever-se-á utilizar uma zaragatoa em meio de transporte para conservar a mesma durante mais tempo, devendo manter-se o produto a 4°C até ao momento de análise. Este foi o procedimento adoptado para todas as amostras recolhidas.

Por outro lado, a colheita das amostras deve ser feita antes do início de qualquer terapêutica, principalmente de terapêutica antifúngica. Caso a doente já tenha iniciado a aplicação de medicação tópica, quer esta tenha acção antifúngica ou não, deve suspendê-la pelo menos uma semana antes da realização da colheita. A aplicação tópica de pomadas ou de cremes poderá dificultar a observação microscópica (exame directo) ou mesmo impedir o desenvolvimento do fungo em cultura (Ferreira, 2008).

As amostras provenientes da Maternidade Alfredo da Costa foram facultadas pelo laboratório de Microbiologia da instituição. Por esse facto para este estudo foram previamente seleccionadas apenas aquelas cujo resultado de crescimento em cultura tinha sido positivo naquele laboratório. No total foram fornecidas 100 amostras provenientes da região de Lisboa. Às amostras de origem cabo-verdiana não foi aplicada qualquer selecção prévia tendo sido recolhidas 116 amostras nas duas



instituições que aceitaram a realização do estudo. Para cada amostra foi também realizado nestes casos um questionário sobre algumas informações das doentes de modo a compreender as possíveis causas da infecção fúngica.

## 2.2. – Isolamento, identificação e manutenção dos isolados

Os isolados foram obtidos a partir de culturas positivas crescidas em meio de Sabouraud adicionado de cloranfenicol, após incubação a 30°C durante pelo menos 48 horas (nas primoculturas de leveduras deve dar-se um tempo de crescimento até 1 mês antes de a cultura ser considerada negativa). Este meio de cultura contém peptona e glucose, que favorece o crescimento das leveduras, cloranfenicol que impede o crescimento de um elevado número de espécies bacterianas e pH ligeiramente ácido que favorece o crescimento das leveduras face ao desenvolvimento bacteriano. A composição do meio de cultura utilizado permitiu o isolamento selectivo das leveduras, pois inibiu o crescimento da flora bacteriana.



Figura 2.1 – Culturas de espécies do género *Candida* em placa de petri.

Algumas amostras foram inoculadas em meio de Sabouraud adicionado de gentamicina e cloranfenicol (Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol® ou SGC®, BioMérieux, França) pois verificou-se crescimento de bactérias no primeiro meio utilizado. A gentamicina complementa a acção do cloranfenicol ao inibir o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Os recipientes utilizados para o crescimento dos fungos patogénicos em cultura são um factor importante em Micologia Médica. Podem ser de dois tipos: placas de *petri* ou tubos de ensaio, e a escolha depende do tipo de fungo esperado e da finalidade do trabalho. As placas de *petri* (figura 2.1) permitem observar, com mais facilidade, a morfologia macroscópica das várias espécies, mas apresentam a desvantagem de o meio de cultura desidratar mais rapidamente, de facilitar as contaminações de organismos saprófitas (bactérias e fungos) do exterior e, mais grave, a contaminação ambiental com esporos de fungos patogénicos. São mais utilizadas no isolamento e cultura de leveduras que requerem poucos dias de incubação e não têm o perigo de contaminar o ambiente.



Figura nº 2.2 – Culturas de espécies do género *Candida* em tubo com rolha de algodão.

Por sua vez, os tubos de ensaio (figura 2.2) permitem o crescimento da cultura com uma menor probabilidade de contaminação. Existem tubos com rolhas de plástico, metal ou rolhas de algodão cardado. As rolhas de plástico ou de metal permitem uma maior autonomia do investigador mas permitem a passagem de ar e, após incubações prolongadas, também a passagem de ácaros para o interior dos

tubos, levando ao aparecimento de contaminações. As rolhas de algodão cardado permitem as trocas gasosas com o exterior e impedem a passagem dos ácaros, mas requerem pessoal de apoio para o fabrico deste tipo de rolhas. Por conseguinte, neste trabalho foram utilizados tubos de ensaio com rolhas de algodão cardado para isolamento das leveduras do género *Candida*.

Para todos os isolados foi observada a morfologia microscópica *in vivo* das leveduras (exame directo das amostras clínicas), efectuado o Teste da Blastese e realizada a identificação através de técnicas moleculares. Para os isolados cujo resultado do Teste da Blastese foi negativo e também nos que não se conseguiu identificação molecular do isolado, foi realizada a identificação bioquímica com as galerias comercialmente disponíveis ID 32C® (BioMérieux, França).

Após o isolamento em cultura pura, todos os isolados foram mantidos a 4°C em meio de Sabouraud adicionado de cloranfenicol e mais tarde em meio de Sabouraud com 15% (p/v) de glicerol à temperatura de -20°C e -80°C.

Na tabela 2.1 estão esquematizados os vários procedimentos utilizados na identificação convencional dos isolados de *Candida* sp. obtidos a partir de amostras clínicas.

Tabela 2.1 - Procedimentos utilizados na identificação convencional de todos isolados clínicos de leveduras isoladas de candidíases vaginais provenientes da cidade da Praia, Cabo-Verde e da cidade de Lisboa, Portugal.

Métodos convencionais de diagnóstico de candidíase		
Amostra	Exame directo	Exame microscópico a fresco com KOH a 20%
	Isolamento	Em meio de cultura de Sabouraud agar adicionado de cloranfenicol e meio Gelose Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol®
Isolado clínico	Identificação presuntiva	Teste da Blastese
	Identificação bioquímica	Provas bioquímicas ID 32C®

### 2.3. - Identificação convencional

#### 2.3.1. - Exame directo

Passou-se suavemente a ponta da zaragatoa sobre uma lâmina previamente desinfetada com álcool a 70%. Seguidamente adicionou-se uma gota de KOH 20% e, depois de se colocar uma lamela por cima da preparação, observou-se a morfologia microscópica com as ampliações de 150X e a 600X. Depois de observado o exame directo, procedeu-se à inoculação do produto biológico em meio de Sabouraud agar com cloranfenicol. Nas culturas onde se observou o crescimento de bactérias fez-se uma nova inoculação da amostra em meio Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol®. A partir de todas as culturas consideradas positivas, ou seja, sempre que se observou crescimento de colónias cremosas, foi realizado o Teste da Blastese. O exame directo é também essencial para esclarecer

dúvidas aquando da identificação de organismos com perfis bioquímicos idênticos (Campbell, 1996). Utiliza-se normalmente o KOH que, sendo um composto alcalino, degrada as células do organismo hospedeiro e de outras substâncias que possam ser confundidas com estruturas fúngicas, mas não afecta as estruturas fúngicas protegidas pela parede celular, tornando-as assim mais visíveis.

### 2.3.2. - Teste da Blastese

A partir de uma colónia isolada em meio de Sabouraud com cloranfenicol incubada durante 48 horas a 30°C foi feita uma suspensão fraca em 200 µL de soro humano, para observação da formação de tubo germinativo. A suspensão foi incubada a 37°C durante 2 horas e 30 minutos. A observação da formação de um tubo germinativo permite identificar presuntivamente o isolado como sendo da espécie *Candida albicans sensu lato*\* (inclui *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. africana*).

Todos os isolados cujo Teste da Blastese apresentou resultado negativo foram considerados não-*albicans* e sujeitos a testes fisiológicos para sua identificação (figura 2.3).

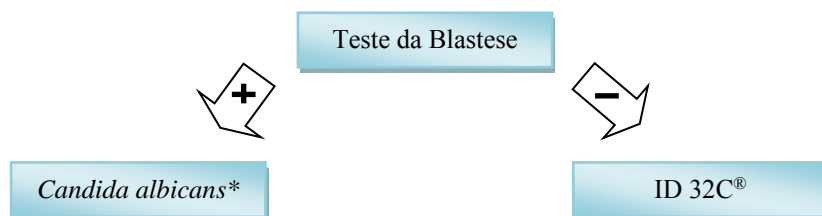


Figura 2.3 - Esquema representativo da metodologia utilizada para identificação dos isolados clínicos.

### 2.3.3. - Testes bioquímicos

Foi utilizado um sistema comercial padronizado para a identificação de leveduras, com 32 testes de assimilação miniaturizados (galerias ID 32C®, BioMérieux, França). Os testes ID32C® apresentam 32 cúpulas, cada uma contendo um substrato desidratado. Incluem 29 testes de assimilação (hidratos de carbono, ácidos orgânicos e aminoácidos), um teste de susceptibilidade (cicloheximida), um teste colorimétrico (esculina) e um controlo negativo.

A partir de uma colónia isolada de uma cultura pura, fez-se uma suspensão em 1,5 mL de solução API® Suspension Médium (BioMérieux, França) com uma turvação ajustada ao valor 2 da escala McFarland. Transferiu-se 250 µL desta suspensão para o meio API® C Médium (BioMérieux, França) e, após a homogeneização da suspensão, foram colocados 135 µL da mesma em cada poço da galeria do teste.

Após 48 horas de incubação a 30°C, foi efectuada a leitura da galeria, observando a presença ou não de turvação nos diferentes poços. Todos os poços onde surgiu a turvação, que corresponde a

crescimento da levedura, foram considerados positivos e os que não apresentaram turvação foram considerados negativos.

A partir dos resultados da leitura do teste foi obtido um perfil numérico, que foi introduzido no programa informático APILAB, BioMérieux®, que se encontra ligado a uma base de dados na internet. É através deste programa que se obtém a identificação da espécie, juntamente com a seguinte informação:

- ◆ Percentagem de identificação (% id), que avalia a proximidade relativa do perfil observado aos perfis das várias espécies da base de dados.
- ◆ Índice t (varia entre 0 e 1), que exprime a proximidade relativa da estirpe observada ao perfil mais típico da base de dados.
- ◆ Comentários sobre a qualidade da identificação que têm em conta os dois parâmetros acima referidos (tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Qualidade da identificação feita pelo sistema ID 32C® (BioMérieux, França) (Adaptado de Prata, 2007).

Qualidade da identificação	% id	t
<b>Excelente</b>	≥ 99,9	≥ 0,75
<b>Muito boa</b>	≥ 99,9	≥ 0,5
<b>Boa</b>	≥ 90,9	≥ 0,25
<b>Acceptável</b>	= 80,0 a 90,0	= 0 a 0,25

O perfil numérico obtido pela leitura das galerias do teste e introduzido no programa informático pode dar cinco possibilidades de identificação:

- ◆ Identificação da espécie – uma única espécie é seleccionada.
- ◆ Identificação ao nível da espécie – 2, 3 ou 4 biótipos da mesma espécie são propostos.
- ◆ Identificação ao nível do género – 2, 3 ou 4 espécies do mesmo género são propostas.
- ◆ Fraca discriminação – se as espécies propostas pertencerem a géneros diferentes.
- ◆ Perfil duvidoso – o perfil não consta da base de dados, o que pode acontecer se for um perfil atípico ou quando a frequência de ocorrência deste perfil é muito baixa. Pode ainda surgir este resultado quando a cultura estudada não está pura, ou seja, quando possui duas ou mais espécies diferentes de leveduras.

## 2.4. - Identificação molecular

Todas as amostras identificadas através dos métodos convencionais foram também identificadas por métodos moleculares. Os dois métodos utilizados foram baseados em duas técnicas moleculares, uma baseada numa reação de PCR multiplex e outra baseada em PCR-RFLP da região ITS do rDNA.

### 2.4.1. – Identificação de espécies de *Candida* pela técnica de PCR multiplex

Todos os isolados clínicos incluídos neste trabalho foram identificados pela técnica de PCR multiplex segundo o protocolo descrito em Carvalho *et al.* (2007).

#### *Preparação do DNA para PCR*

Para a aplicação desta técnica não é necessária a extracção prévia de DNA das leveduras. Basta que cada isolado clínico cresça em meio de Malte durante 48 horas e uma porção quase imperceptível de colónia é retirada com a ponta de um palito esterilizado para aplicação directa na mistura reaccional de PCR.

#### *Primers utilizados na reacção de PCR*

Foram utilizados dois *primers* universais específicos para fungos UNI1 e UNI2, que permitem amplificar as regiões ITS1 e ITS2, incluindo a região 5,8S do rRNA e os *primers* específicos para as espécies *C. albicans* (Calb), *C. krusei* (Ckru), *C. parapsilosis* (Cpar), *C. tropicalis* (Ctro), *C. lusitaniae* (Clus), *C. guilliermondii* (Cgui), *C. dubliniensis* (Cdub) e *C. glabrata* (Cgla) (tabela 2.3).

A figura 2.4 representa a forma como se organizam os genes ribossómicos e os locais de hibridação dos *primers* universais e específicos para as espécies do género *Candida* anteriormente mencionadas.

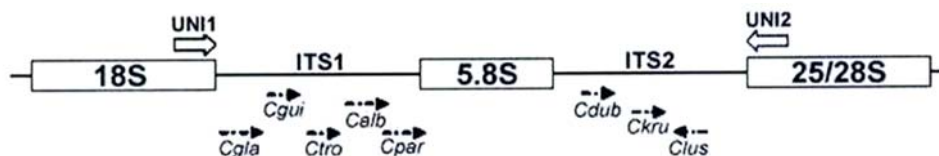


Figura 2.4 - Esquema representativo da organização dos genes ribossómicos e dos *primers* universais e específicos das diferentes espécies de *Candida* (Carvalho *et al.*, 2007).

Tabela 2.3 - *Primers* específicos utilizados para cada espécie e dimensão dos fragmentos esperados após amplificação por PCR multiplex (adaptado de Carvalho *et al.*, 2007).

Espécies	Primer	Sequência (5' – 3')	Dimensão do fragmento amplificado com o Primer Universal/ Específico (pb)
<b>Primer Universal</b>	UNI1	GTCAAACCTGGTCATTTA	950/970
<b>Primer Universal</b>	UNI2	TTCTTTTCCTCCGCTTATTG	
<i>Candida albicans</i>	Calb	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	583/446
<i>Candida glabrata</i>	Cgla	TTGTCTGAGCTCGGAGAGAG	929/ 839
<i>Candida tropicalis</i>	Ctro	GATTTGCTTAATTGCCCCAC	583/507
<i>Candida parapsilosis</i>	Cpar	GTCAACCGATTATTTAATAG	570/370
<i>Candida krusei</i>	Ckru	CTGGCCGAGCGAACTAGACT	590/169
<i>Candida lusitaniae</i>	Clus	TTCGGAGCAACGCCTAACCG	433/ 329
<i>Candida guilliermondii</i>	Cgui	TTGGCCTAGAGATAGGTTGG	668/ 512
<i>Candida dubliniensis</i>	Cdub	CTCAAACCCCTAGGGTTTGG	591/ 217

*Condições da reacção de PCR*

A mistura reaccional utilizada para detectar por PCR multiplex com *primers* específicos a presença de DNA das espécies de *Candida* mais frequentes, encontra-se descrita na tabela 2.4.

A reacção de PCR foi realizada num termociclador Tpersonal Combi (Biometra) e iniciou-se com um pré-aquecimento para desnaturação do DNA à temperatura de 94°C durante 10 minutos, seguida de mais 15 segundos a 94°C, de modo a possibilitar a ligação dos *primers* à cadeia alvo do DNA. A hibridação dos *primers* foi realizada a 55°C durante 30 segundos, seguindo-se o passo de extensão a 65°C durante 45 segundos, repetindo-se este processo por 40 ciclos. A extensão final ocorreu a 65°C durante 2 minutos.

Tabela 2.4 - Mistura reaccional usada nas reacções de PCR multiplex para a identificação de isolados clínicos do género *Candida*.

Reagente	Concentração final	Volume (µL)
Água bidestilada	-	15,42
Tampão (10x)	0,8x	1,28
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	3,5 mM	0,7
dNTPs (10 mM cada)	250 µM	0,4
Mistura de <i>primers</i> (5 µM) <sup>3</sup>	0,8 µM	1,0
Taq polimerase 5U/µL <sup>4</sup>	1 U	0,2
Células de levedura	Pequena porção de colónia com 2 a 4 dias	

<sup>3</sup> *Primers* MWG OligoSynthesis® – Biotech, Alemanha

<sup>4</sup> Enzima Taq DNA polimerase, BIOTAQ® DNA Polymerase (BIOLINE, Alemanha).

*Detecção dos produtos amplificados*

➤ Preparação do gel de agarose: numa balança analítica pesou-se 0,75 g de agarose (Gibco, BRL, Reino Unido) num erlenmeyer, dissolvendo-a em 50 mL de tampão TBE 0,5x (1,0 mM Tris; 0,9 mM ácido bórico; 0,01 mM EDTA, pH 8) por forma obter um gel a 1,5%. Aqueceu-se a mistura até ficar homogénea e não se visualizarem grânulos de agarose. Seguidamente adicionaram-se 3,5 µL de brometo de etídio (Sigma, USA) à solução de agarose já cozida e, antes de se iniciar a polimerização, verteu-se a mesma sobre o suporte com o pente previamente colocado, deixando o gel a solidificar. De modo a acelerar a polimerização pode-se colocar o suporte com o gel de agarose à temperatura de 4°C. Depois de polimerizado, o gel foi colocado na tina de electroforese previamente cheia com tampão TBE 0,5x.

➤ Electroforese do gel de agarose: adicionaram-se 3 µL de solução de tampão de arrastamento ou tampão azul de bromofenol, [30% (p/v) glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 2mM EDTA] a 10 µL do produto da reacção de PCR e a mistura foi aplicada no gel. Utilizou-se como marcador de pesos moleculares GeneRule 100 bp DNA Ladder Plus® (0,5mg DNA/mL) (FERMENTAS, Canada) e a electroforese decorreu durante 60 minutos à temperatura ambiente.

➤ Visualização dos produtos amplificados: as bandas resultantes da reacção de PCR foram visualizadas através do transiluminador de luz Ultra-Violeta (UV) e as imagens foram captadas e digitalizadas através do sistema UViDOC® (UviTec, Alfagene).

Os perfis electroforéticos obtidos foram analisados por comparação visual. Através do marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA 100 pb observou-se o tamanho aproximado dos produtos amplificados e comparou-se com o tamanho esperado dos produtos descrito no trabalho realizado por Carvalho *et al.* (2007) estando representados na figura 2.5 os possíveis perfis que podem ser obtidos.

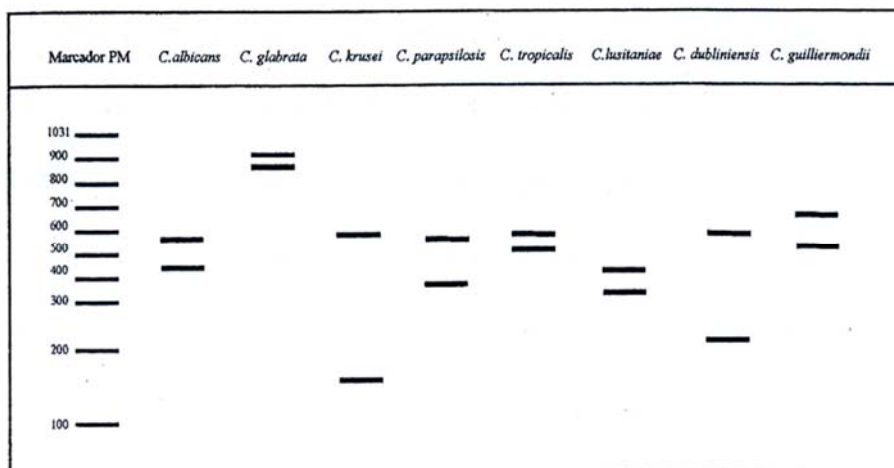


Figura 2.5 - Esquema representativo das bandas esperadas depois da amplificação por PCR multiplex do DNA das espécies de *Candida* mais comuns de candidíase.

Para outras espécies de fungos não referenciadas na tabela 2.3, para as quais não existe um *primer* específico, a reacção de PCR iria originar apenas uma banda de dimensão variável, referente à amplificação da região ITS do rDNA com os *primers* universais.

As amostras, cuja identificação não foi possível por meio da técnica de PCR multiplex foram identificadas através de RFLP da região ITS do rDNA.

#### 2.4.2. – Identificação de espécies de *Candida* pela técnica de PCR-RFLP

##### Extracção de DNA

Para a extracção de DNA dos isolados clínicos utilizou-se o método das microesferas segundo a metodologia abaixo descrita:

- ◆ As culturas são crescidas em meio sólido (agar de Sabouraud com cloranfenicol) durante pelo menos 48 horas;
- ◆ Num tubo eppendorf (1,5 mL) contendo um volume de esferas de vidro (0,4-0,6 mm de diâmetro) equivalente a 100 µL deitam-se 500 µL de Tampão de Lise (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,3 % (p/v), pH 8);



- ◆ Faz uma suspensão celular muito densa que depois se agita fortemente no vortex durante três minutos;
- ◆ Coloca-se a suspensão no termobloco a 65°C durante uma hora;
- ◆ Em seguida, a suspensão é novamente agitada no vortex durante três minutos e centrifugada durante 10 minutos a 11 000 g;
- ◆ Recupera-se o sobrenadante que contém o DNA para um novo tubo e guarda-se a -20°C. O DNA nestas condições mantém-se em bom estado por um período superior a um ano.
- ◆ Preparação do DNA para PCR: para utilizar o DNA nas reacções de PCR é feita uma diluição da extracção de DNA de 1:750, em água destilada Braun, e guardam-se alíquotas (100 µL) a -20°C. Assim diluído, o DNA mantém-se em bom estado durante alguns meses.

#### *Primers utilizados na reacção de PCR*

A amplificação da região ITS do DNA ribossómico foi feita utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4. A sequência dos *primers* está descrita na tabela 2.5:

Tabela 2.5 - Sequência oligonucleotídica dos *primers* ITS1 e ITS4.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<b>ITS1 (<i>forward</i>)</b>	5'-TCC GTA GAA CGT GCG G-3'
<b>ITS4 (<i>reverse</i>)</b>	5'-TCG TCG GCT TAT TGA TAT GC-3'

#### *Amplificação da região ITS do rDNA por PCR*

A mistura reacção da reacção de PCR para a amplificação da região ITS (regiões ITS1 e ITS2 e subunidade 5,8S) do rDNA de cada amostra está esquematizada na tabela 2.6:

Tabela 2.6 - Mistura reacção usada nas reacções de PCR para amplificação da região ITS do DNA ribossómico de isolados clínicos do género *Candida*.

<i>Solução stock</i>	<i>Concentração final</i>	<i>Volume (µL)</i>
<b>Água bidestilada</b>	-	12
<b>Tampão (10x)</b>	1x	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	3,5 mM	2,0
<b>dNTPs (1,25 mM cada)</b>	250 µM	2,5
<b>Mistura de <i>primers</i> (5 µM)</b>	0,8 µM	0,8
<b>Taq polimerase 5U/µL</b>	1 U	0,2
<b>DNA 1:750</b>	1:1750	5,0

A reacção de PCR foi realizada num termociclador Tpersonal Combi® (Biometra) e o ciclo de PCR compreendeu um pré-aquecimento à temperatura de 95°C durante 6 minutos, 40 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 65°C, 60 segundos a 72°C, com extensão final durante 6 minutos a 72°C.



*Detecção dos produtos amplificados*

Os produtos amplificados foram detectados utilizando o procedimento semelhante ao descrito no ponto 2.4.1 apenas se alterando a percentagem de agarose utilizada no gel para 1%, a quantidade de solução de tampão de arrastamento (2 µL) e de produto de PCR (8 µL).

A electroforese foi realizada à temperatura ambiente durante 30 minutos a 100V. As bandas correspondentes à região ITS foram visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens foram captadas e digitalizadas com um sistema UVIDOC<sup>®</sup>, Alfagene.

*RFLP da região ITS do rDNA*

Para a realização da reacção de restrição foi utilizada a enzima de restrição *MspI* (Promega, USA) cuja sequência de corte está descrita na tabela 2.7:

Tabela 2.7 - Sequência e região de corte identificada pela enzima de restrição *MspI*.

	Sequência
<b><i>MspI</i></b>	C↓CG G
	G GC↑C

Tendo o cuidado de colocar previamente os tubos com a região ITS amplificada no gelo, preparou-se a mistura reaccional pipetando, para cada amostra, os reagentes e quantidades pela ordem apresentada na tabela 2.8, seguindo as instruções do fabricante:

Tabela 2.8 - Mistura reaccional usada em cada reacção de restrição com a enzima *MspI* para a identificação de isolados clínicos do género *Candida*.

Solução stock	Volume por tubo (µL)
<b>Água destilada (Braun<sup>®</sup>)</b>	16,3
<b>Tampão RE 10x</b>	2,0
<b>Tampão BSA acetilado, 10µg/µL</b>	0,2
<b>Enzima <i>MspI</i>, 10µg/µL</b>	0,5
Volume de mix por tubo:	<b>19,0</b>

Adicionou-se 1 µL da solução de DNA com a região ITS amplificada de cada amostra a cada tubinho de 0,2 mL, perfazendo um volume final de reacção de 20 µL. A mistura reaccional foi incubada à temperatura óptima de actuação indicada pelo fabricante que neste caso, é de 37°C durante pelo menos 2 horas.

*Detecção dos fragmentos de restrição*

Os produtos de restrição foram detectados por electroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio utilizando o mesmo procedimento referido no ponto 2.4.1, mas alterando mais uma vez a percentagem de agarose (2%), a quantidade de solução de tampão de arrastamento (2 µL) e a

quantidade de produto de PCR (20 µL). Na tabela 2.11 está representada a composição do gel de agarose a 2% para um volume final de 50 mL.

A electroforese decorreu a 50V durante 100 minutos, à temperatura ambiente.

As bandas correspondentes à restrição da região ITS pela enzima *MspI* foram visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens foram captadas e digitalizadas com um sistema UVIDOC®, Alfagene.

#### Interpretação dos resultados

As bandas obtidas foram comparadas com o protocolo da técnica de PCR-RFLP pertencente ao laboratório de micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), estando descritos na tabela 2.9 o tamanho dos produtos esperado (adaptado de Mirhendi *et al.*, 2006).

Tabela 2.9 - Dimensões das bandas da região ITS do DNA ribossómico de diferentes espécies do género *Candida* e dimensões das bandas após restrição com enzima *MspI*.

<i>Espécie</i>	<i>Região ITS (pb)</i>	<i>Produtos de restrição (pb)</i>
<i>C. albicans</i>	535	297, 238
<i>C. glabrata</i>	871	357, 214
<i>C. lusitaniae</i>	420	300, 140
<i>C. krusei</i>	510	261, 249
<i>C. tropicalis</i>	524	340, 184
<i>C. parapsilosis</i>	520	520

## 2.5. – Amplificação do gene *HWP1*

A amplificação do gene *HWP1* foi realizada para todos os isolados clínicos provenientes de Cabo-Verde cuja identificação molecular da espécie foi *C. albicans* a fim de detectar a existência de isolados de *C. africana*, visto os métodos convencionais e moleculares utilizados na identificação de espécies patogénicas do género *Candida* não o fazerem.

#### Preparação do DNA para PCR

O DNA dos isolados clínicos extraído segundo a metodologia descrita no ponto 2.4.2 foi diluído na razão de 1:750.

#### Primers utilizados na reacção de PCR

A amplificação do gene *HWP1* foi feita utilizando os primers CR-f e CR-r cuja sequência está descrita na tabela 2.10 (Romeo e Criseo, 2008).

Tabela 2.10 - Sequência oligonucleotídica dos *primers* CR-f e CR-r.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<b>CR-f (<i>forward</i>)</b>	5'-GCT ACC ACT TCA GAA TCA TCA TC-3'
<b>CR-f (<i>reverse</i>)</b>	5'-GCA CCT TCA GTC GTA GAG ACG-3'

#### *Amplificação do gene HWP1 por PCR*

A mistura reaccional da reacção de PCR para a amplificação do gene *HWP1* de cada isolado clínico está esquematizada na tabela 2.11 baseado em Romeo e Criseo (2008) e Dieng *et al.* (2012), para um volume final de 25 µL.

Tabela 2.11 - Mistura reaccional usada nas reacções de PCR para amplificação do gene *HWP1* dos isolados clínicos de leveduras da espécie *C. albicans* provenientes de Cabo-Verde.

<i>Solução stock</i>	<i>Concentração final</i>	<i>Volume (µL)</i>
<b>Água bidestilada</b>	-	18,25
<b>Tampão (10x)</b>	1x	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	3,5 mM	1,5
<b>dNTPs (1,25 mM cada)</b>	0,2 mM	0,5
<b>Primers 50 pmol/µL (mix do par)</b>	2 pmol/µL	1,0 (0,5 de cada <i>primer</i> )
<b>Taq polimerase 5U/µL</b>	1U	0,25
<b>DNA genómico (1:750)</b>	-	1

A reacção de PCR foi realizada num termociclador Tpersonal Combi® (Biometra) e o ciclo de PCR compreendeu um pré-aquecimento à temperatura de 95°C durante 10 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 40 segundos a 58°C, 55 segundos a 72°C, com extensão final durante 10 minutos a 72°C.

#### *Deteção dos produtos amplificados*

Os produtos amplificados foram detectados utilizando o procedimento semelhante ao descrito no ponto 2.4.1 apenas se alterando a percentagem de agarose utilizada no gel para 1,3%, a quantidade de solução de tampão de arrastamento (3 µL) e de produto de PCR (10 µL).

A electroforese decorreu a 50V durante 60 minutos, à temperatura ambiente. As bandas correspondentes aos fragmentos do gene *HWP1* foram visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens captadas e digitalizadas com um sistema UVIDOC®, Alfagene. Os produtos amplificados foram comparados com as dimensões descritas em Romeo e Criseo, 2008: ~1000 pb para *C. albicans*, ~700 pb para *C. africana* e ~570 pb para *C. dubliniensis*.

## 2.6. – Amplificação e sequenciação do gene *ERG11*

Foram seleccionadas quatro estirpes de *C. albicans*, duas de isolados provenientes de Portugal e duas de isolados de Cabo-Verde. De cada proveniência, uma das estirpes era resistente ao antifúngico fluconazol e voriconazol e a outra susceptível a ambos os antifúngicos.

### *Preparação do DNA para PCR*

O DNA dos quatro isolados clínicos anteriormente extraído (ponto 2.4.2) foi diluído na razão de 1:200.

### *Primers utilizados na reacção de PCR*

O gene *ERG11* tem um comprimento demasiado elevado para ser amplificado e sequenciado numa única reacção. Foi, por isso, necessário dividir a sua sequência em três secções e utilizar três pares de *primers* para a sua amplificação total. Na tabela 2.12 encontram-se descritas as sequências nucleotídicas referentes a cada par de *primers* e a dimensão dos fragmentos resultantes da amplificação por PCR (Xu *et al.*, 2008).

Tabela 2.12 – *Primers* utilizados para amplificação do gene *ERG11* e dimensão dos fragmentos esperados após PCR.

	<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')	Dimensão do fragmento amplificado (pb)
<b>Par 1</b>	ERG11Sec1A	TTAGTGTTTTATTGGATTCTTGTT	482
	ERG11Sec1B	TCTCATTTTCATCACCAAATAAAGATC	
<b>Par 2</b>	ERG11Sec2A	ACCAGAAATTACTATTTTCACTGCTTCA	482
	ERG11Sec2B	AAGTCAAATCATTCAAATCACCACCT	
<b>Par 3</b>	ERG11Sec3A	AGGTGGTGATTGGAATGATTTGACTT	488
	ERG11Sec3B	GAACTATAATCAGGGTCAGGCACTTT	

### *Condições da reacção de PCR*

A mistura reaccional para a amplificação do gene *ERG11* nos quatro isolados clínicos de *C. albicans* foi feita para um volume final de 25 µL e encontra-se descrita na tabela 2.13.

Tabela 2.13 – Mistura reaccional utilizada na reacção de PCR para a amplificação do gene *ERG11* dos quatro isolados clínicos da espécie *C. albicans*.

Solução stock	Concentração final	Volume por tubo (µL)
Água bidestilada Braun	-	17,75
Tampão 10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3,5 mM	2,0
dNTP's 10 mM	0,2 mM	0,5
Primers 50 pmol/µL (mix do par)	2 pmol/µL	1,0 (0,5 de cada <i>primer</i> )
Taq polimerase 5U/µL	1U	0,25
DNA genómico (1:200)	-	1

A reacção de PCR foi realizada num termociclador Tpersonal Combi (Biometra) e compreendeu um ciclo de desnaturação do DNA, a uma temperatura de 94°C durante 5 minutos seguida de 33 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 61°C e 60 segundos a 72°C, e uma extensão final durante 7 minutos a 72°C.

#### *Detecção dos produtos amplificados*

Os produtos amplificados foram detectados utilizando o procedimento semelhante ao descrito no ponto 2.4.1, mas alterando algumas quantidades. A um gel de agarose com a concentração de 1%, aplicou-se todo o produto de PCR (25 µL) adicionado de 3 µL de solução de tampão de arrastamento.

A electroforese decorreu a 50V durante 60 minutos, à temperatura ambiente. As bandas correspondentes aos três fragmentos que constituem o gene *ERG11* foram visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens captadas e digitalizadas com um sistema UVIDOC®, Alfacore. Os produtos amplificados foram comparados com as dimensões descritas em Xu *et al.*, 2008, sendo depois enviados para sequenciação na empresa Stabvida.

#### *Análise dos fragmentos sequenciados*

A verificação e correcção dos fragmentos sequenciados foi realizada com o apoio dos programas EditSeq® (3.96) e ClustalX® (versão 2.0.11).

Com o auxílio do programa Chromas® (versão 2.4) e também novamente do programa ClustalX® (versão 2.0.11), analisaram-se visualmente os fragmentos de cada uma das três porções do gene *ERG11* das quatro estirpes de *C. albicans* estudadas procurando a existência de diferenças nucleotídicas relevantes entre os isolados sensíveis e resistentes.

## **2.7. - Determinação da susceptibilidade *in vitro* dos isolados clínicos do género *Candida***

### **2.7.1. - Método Kirby-Bauer ou de difusão em disco**

#### *Preparação do meio de cultura*

O meio de cultura indicado para o estudo da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos pelo método de Kirby-Bauer é o meio de Müller-Hinton. De acordo com as indicações da norma M44-A do CLSI, deve ser previamente acrescentado à sua composição 2% de glucose e 0,5 µg/mL de azul-de-metileno, que permitirá uma melhor definição quando se observam os limites dos halos de inibição.

#### *Preparação do inóculo*

É feita uma suspensão das leveduras a partir de algumas colónias em 1 mL de água bidestilada esterilizada, de modo a que essa suspensão apresente uma turvação de 0,5 na escala de McFarland. Com este valor a suspensão possui entre 1 a 5×10<sup>6</sup> células/mL.

### *Inoculação das placas*

A superfície do meio Müller-Hinton nas placas de *petri* deve estar bem seca antes de se proceder à inoculação das suspensões. Uma zaragatoa esterilizada é imersa na suspensão de levedura e é retirado o excesso de inóculo rodando a zaragatoa contra a parede interna e seca do eppendorf. Com a zaragatoa humedecida, inocula-se a suspensão na superfície do meio, em estrias apertadas, em três direcções diferentes, de forma a cobrir homogeneamente toda a sua superfície. Não se deve pressionar demasiado para não danificar o meio de cultura.

No presente trabalho utilizaram-se discos comercialmente disponíveis (Becton Dickinson e Oxoid®) impregnados com 25 µg de fluconazol e com 1 µg de voriconazol. Foram aplicados pelo menos 5 minutos após a inoculação da suspensão da levedura para que esta tivesse tempo de ser absorvida pelo meio de cultura. A aplicação de cada disco no centro do meio de cultura da placa de *petri* é feita com o auxílio de uma pinça esterilizada, tendo o cuidado de o pressionar ligeiramente contra a superfície do meio, de forma a assegurar um contacto completo do disco ao meio.

Todas as placas de *petri* foram seladas com *parafilm*. Os fungos, nomeadamente as leveduras, são seres aeróbios, logo necessitam de oxigénio para sobreviver. Quando os fungos são inoculados em placa de *petri*, de modo a diminuir a probabilidade do aparecimento de contaminações para o seu interior ou para o exterior, isola-se a placa utilizando *parafilm*. As placas foram incubadas invertidas a 30°C durante 48 horas.

### *Aplicação dos discos impregnados com óleos essenciais*

No presente trabalho utilizaram-se discos brancos esterilizados impregnados com óleos essenciais de alecrim (Herdade Vale Covo), árvore-do-chá (Biover®) e rosmarinho (Herdade Vale Covo) e com extracto de grainha de toranja (Planta Pol®)

Como foi uma metodologia aplicada pela primeira vez a novos produtos, foram realizados testes de optimização prévios para se avaliar qual a quantidade ideal de óleo a ser utilizada no estudo. Utilizou-se como base a estirpe de referência *C. albicans* ATCC 90028 e foram igualmente testadas três espécies de isolados clínicos resistentes aos antifúngicos convencionais fluconazol e voriconazol provenientes de Cabo-Verde e três espécies resistentes provenientes de Portugal.

Os discos virgens esterilizados foram emersos no óleo essencial e extracto vegetal durante 5 minutos, 10 minutos, 2 horas e 24 horas. Testaram-se igualmente discos com uma inoculação de 1, 3, 5, 10, 20, 30 e 40 µl de cada óleo directamente sobre o disco colocado sobre uma folha de papel de filtro esterilizada (Ferronato *et al.*, 2007), realizando o ensaio final com a inoculação de 10, 20, 30 e 40 µL de óleo essencial e extracto vegetal.

Com o auxílio de uma pinça esterilizada foi retirado o excesso de óleo/extracto de cada disco contra uma folha de papel de filtro esterilizada e repetiu-se o procedimento de aplicação dos discos no meio de cultura preconizado pelo CLSI anteriormente descrito.

### Leitura das placas

Nas placas com os antifúngicos fluconazol e voriconazol a leitura dos resultados foi feita após as 48 horas de incubação, seguindo as instruções do fabricante. Verificou-se se o crescimento era homogêneo e se as zonas de inibição possuíam halos uniformes e circulares, em torno do disco. O diâmetro dos halos de inibição e as respectivas concentrações mínimas inibitórias (CMI) foram determinadas e registadas com o auxílio de sistema informático BIOMIC Expert-System® (Giles Scientific Inc.).

Nas placas com os óleos essenciais e o extracto foi feita a leitura dos resultados após 48 horas de incubação. O diâmetro dos halos de inibição foi determinado e registado de forma manual com o auxílio de uma régua graduada em virtude do sistema informático não contemplar a sua leitura.

### Interpretação dos resultados

Os critérios de interpretação dos halos de inibição e respectivas CMIs relativas ao fluconazol e voriconazol encontram-se descritos na tabela 2.14. Cada estirpe foi classificada como:

- ◆ Sensível (S): a infecção por uma estirpe desta categoria pode ser apropriadamente tratada com a dose de agente antimicrobiano recomendada.
- ◆ Sensível dependente da dose (SDD): estirpes para as quais a sensibilidade depende de se atingir a concentração sistémica máxima possível de antifúngico.
- ◆ Resistentes (R): estirpes que não são inibidas pelas concentrações sistémicas que se obtêm após a dose normal do agente antimicrobiano.

De acordo com a norma M44-P, quando a CMI se encontra no limiar entre duas categorias, deverá classificar-se a sensibilidade do isolado na categoria superior.

Tabela 2.14 - Critérios de interpretação dos halos de inibição e respectivas CMIs para o fluconazol e o voriconazol (Adaptado de Gomes, 2012).

Antifúngico	Concentração de fármaco no disco (µg)	Diâmetro do halo de inibição			CMI equivalente (µg/mL)		
		R	SDD	S	R	SDD	S
<b>Fluconazol</b>	25	≤14	15-18	≥19	≥64	16-32	≤8
<b>Voriconazol</b>	1	<13	14-16	>17	>4	2	<1

Os critérios de interpretação dos halos de inibição relativos aos óleos essenciais e ao extracto estão descritos na tabela 2.15:

Tabela 2.15 - Critérios de interpretação dos halos de inibição para os óleos essenciais e extracto vegetal.

Halo (ausência vs presença)	Resultado
Ausência	Crescimento sem qualquer inibição
Presença	Inibição de crescimento

### 3 – Resultados

"São todos maus descobridores, os que pensam que não há terra quando conseguem ver apenas o mar."

Francis Baco, filósofo inglês

#### 3.1. – Origem e caracterização dos isolados

Neste trabalho foram recolhidas 216 amostras de exsudados vaginais provenientes de Portugal e de Cabo-Verde, 100 e 116 respectivamente. As amostras amavelmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Maternidade Alfredo da Costa já eram todas à partida positivas pois previamente foi realizada uma triagem nesse laboratório utilizando meios cromogénicos, eliminando deste modo as amostras cujo resultado foi negativo para leveduras do género *Candida*. Deste modo, e nestas condições, foram assim cedidos 100 isolados clínicos por esta instituição lisboeta. A recolha em Cabo-Verde envolveu condições diferentes. Não sendo possível fazer previamente uma selecção de casos positivos previamente confirmados ainda nas instituições onde foi efectuada a recolha, esta só foi posteriormente realizada no Laboratório de Micologia do IHMT. Deste modo, a partir das 116 amostras recolhidas desta proveniência, obtiveram-se somente 42 isolados clínicos.

Relativamente à idade das doentes e tendo em conta os 142 isolados clínicos verificou-se que a idade das pacientes se encontrava compreendida entre os 13 e os 50 anos. Nas amostras de Portugal observou-se uma ocorrência de infecção entre os 13 e os 43 anos e em Cabo-Verde entre os 15 e os 50 anos. Na tabela seguinte apresenta-se a percentagem de isolados clínicos obtidos em Cabo-Verde e em Portugal em relação à idade das doentes, organizando os resultados em quatro grupos etários.

Tabela 3.1 – Percentagem de isolados clínicos obtidos de Portugal (PT) e Cabo-Verde (CV)<sup>1</sup> em relação aos grupos etários das doentes.

	< 20 anos	≥ 20 e ≤ 30 anos	> 30 e ≤ 40 anos	> 40 anos
CV	20	60	17,5	2,5
PT	21	37	38	4

Quanto ao número de grávidas e não grávidas que sofreram um episódio de candidíase verificou-se que em Portugal 75% (75/100) dos isolados clínicos corresponderam a mulheres grávidas e 25% (25/100) a não grávidas, enquanto em Cabo-Verde 54,8% (23/42) isolados clínicos eram de mulheres grávidas e 45,2% (19/42) de mulheres não grávidas.

<sup>1</sup>Em dois dos 42 isolados não foi possível saber a idade das pacientes, entrando para a contagem apenas 40 isolados.



### 3.2. – Identificação convencional (exame directo, Teste da Blastese, ID32C®)

Iniciou-se o estudo dos dois grupos de isolados clínicos com a aplicação da metodologia de identificação convencional efectuando-se em primeiro lugar o exame directo de cada uma das amostras onde se pôde observar ou não estruturas fúngicas (figura 3.1).

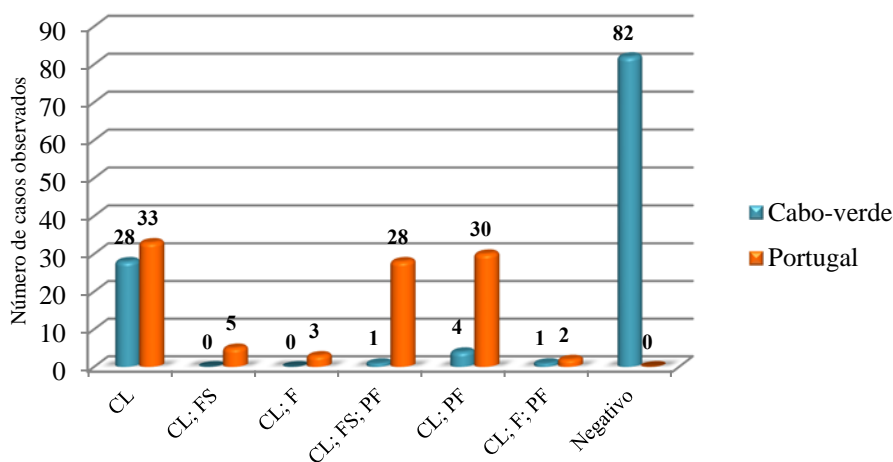


Figura 3.1 – Estruturas fúngicas observadas nas 216 amostras estudadas.

Legenda: CL: Células leveduriformes; F: Filamentos; FS: Filamentos septados; PF: Pseudofilamentos.

Depois de passadas pelo menos 48 horas após inoculação e incubação das amostras clínicas em meio de Sabouraud com cloranfenicol a 30°C, sempre que se observou crescimento de leveduras, estas foram submetidas ao Teste da Blastese. Este foi considerado positivo sempre que foi observada a formação de tubo germinativo após 2 horas e 30 minutos de incubação em soro humano, a 37°C (figura 3.2). Os resultados obtidos com os isolados de Portugal e de Cabo-Verde encontram-se representados no anexo 1.

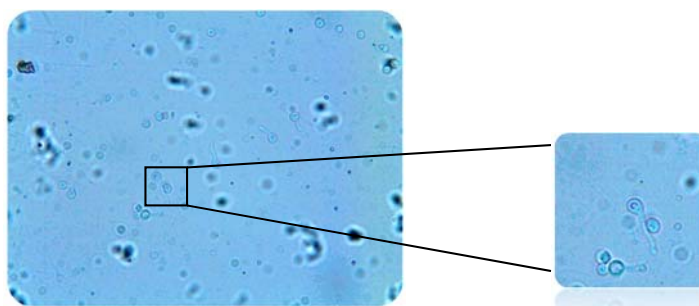


Figura 3.2 – Observação de tubos germinativos num Teste da Blastese positivo (amostra 17).

Das 100 leveduras estudadas de origem Portuguesa 68% (68/100) formaram tubo germinativo enquanto que das 42 leveduras estudadas provenientes de Cabo-Verde, somente 54,8% (23/42) formaram tubo germinativo.

Realizaram-se testes bioquímicos com os isolados cujo resultado do Teste da Blastese foi negativo e em que a identificação molecular foi de *Candida não-albicans*, e também com todos os isolados que não conseguiram ser identificados nem pelo Teste da Blastese nem por identificação molecular. Foram sujeitas ao teste bioquímico por API (ID32C<sup>®</sup>, BioMérieux) 21 amostras de origem portuguesas e 13 amostras origem cabo-verdiana, estando os resultados apresentados no anexo 1. Na figura 3.3 e 3.4 são apresentados os resultados da identificação convencional de todos os isolados provenientes de Portugal e de Cabo-Verde, respectivamente.

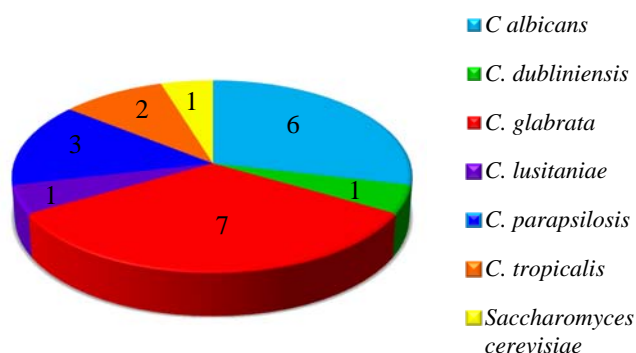


Figura 3.3 – Resultados da identificação convencional dos isolados de Portugal (por Teste da Blastese e por API, ID32C<sup>®</sup>, BioMérieux, França).

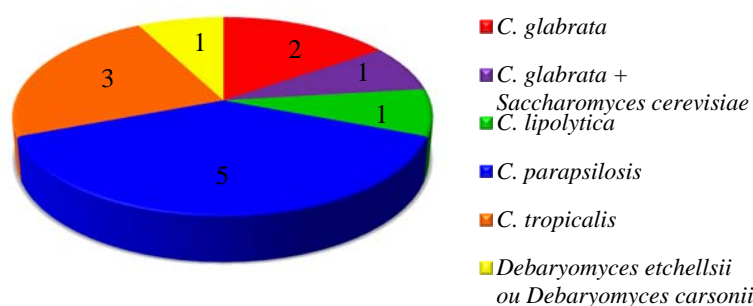


Figura 3.4 – Resultados da identificação convencional dos isolados de Cabo-Verde (por Teste da Blastese e por API, ID32C<sup>®</sup>, BioMérieux, França).

### 3.3. - Identificação molecular

De modo a obter uma identificação mais rigorosa e também avaliar a frequência e a variabilidade das espécies não só em cada um dos locais geográficos estudados (Portugal e Cabo-Verde) como também realizar uma comparação entre estas duas zonas distintas aplicaram-se duas técnicas moleculares: PCR multiplex e PCR-RFLP. Primeiramente utilizou-se a técnica do PCR multiplex e, para os isolados cuja identificação não foi possível através desta técnica, recorreu-se à técnica de PCR-RFLP.

#### 3.3.1. – PCR multiplex

Após optimização da reacção de amplificação por PCR multiplex com os *primers* universais específicos para fungos UNI1 e UNI2 e os *primers* específicos de cada uma das oito espécies que esta técnica permite identificar, submeteram-se os 100 isolados de origem Portuguesa mas somente se obteve a identificação de 83 (83%) isolados até à espécie. Quanto aos de Cabo-Verde, dos 42 isolados estudados por esta técnica, apenas um não apresentou quaisquer bandas de amplificação apesar de terem sido realizadas pelo menos três tentativas. Os resultados obtidos da identificação pela técnica do PCR multiplex dos isolados provenientes de Portugal e Cabo-Verde estão representados nas figuras 3.5 e 3.6.

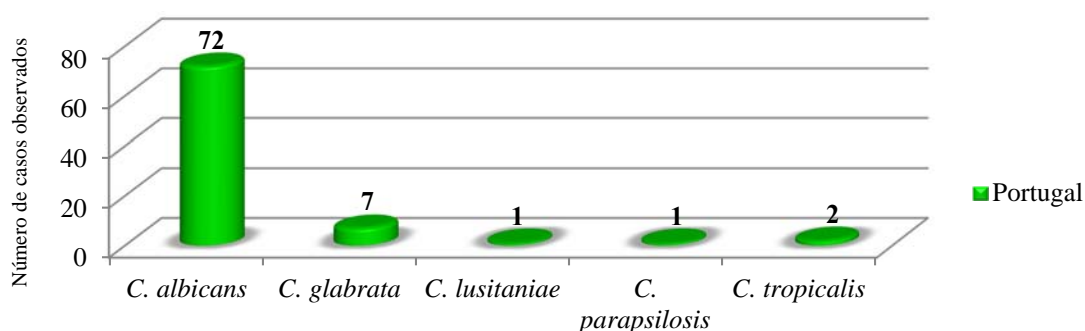


Figura 3.5 – Resultados da identificação dos isolados provenientes de Portugal pela técnica de PCR multiplex.

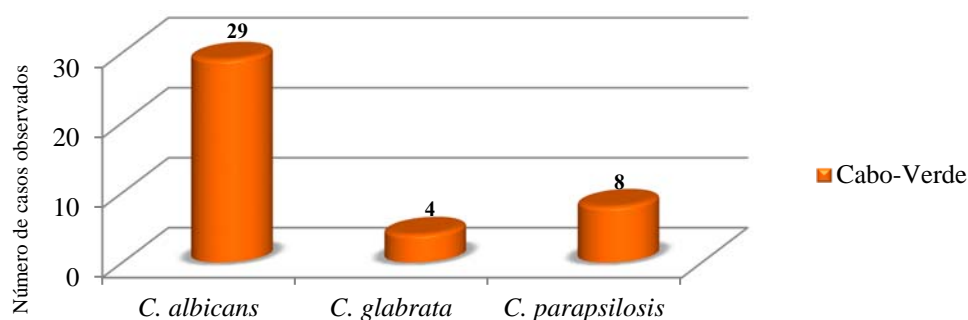


Figura 3.6 – Resultados da identificação dos isolados provenientes de Cabo-Verde pela técnica de PCR multiplex.

### 3.3.2. – PCR-RFLP

Esta técnica foi utilizada para a identificação de 17 dos isolados provenientes de Portugal utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4, tendo sido obtida a identificação somente de 9 isolados enquanto que os outros 8 permaneceram por identificar. No caso de Cabo-Verde apenas um isolado foi sujeito à identificação por RFLP mas também não se obteve qualquer banda electroforética que o permitisse identificar. Na figura 3.7 estão representadas as espécies identificadas por esta técnica.

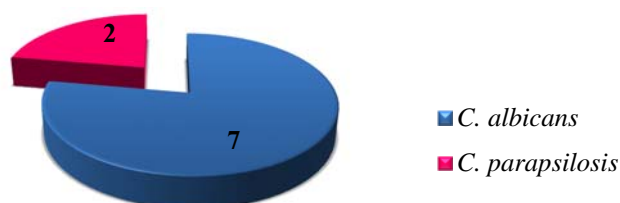


Figura 3.7 – Resultados da identificação pela técnica de PCR-RFLP dos isolados provenientes de Portugal.

Na tabela seguinte (tabela 3.2) está representado o número total de isolados obtidos a partir das amostras provenientes dos dois países, o número de espécies e respectivas percentagens.

Tabela 3.2 – Número total de espécies provenientes de isolados clínicos de Portugal e de Cabo-Verde identificadas conjuntamente pelo método convencional ID32C® (BioMérieux, França) e pelos métodos moleculares PCR multiplex e PCR-RFLP.

	Portugal (n=100)		Cabo-Verde (n=42)		Total (n=142)	
	Nº IC	%	Nº IC	%	Nº IC	%
<i>C. albicans</i>	85	85	29	69	114	80,3
<i>C. glabrata</i>	8	8	4	10	12	4,45
<i>C. lusitaniae</i>	1	1	0	0	1	0,7
<i>C. parapsilosis</i>	3	3	8	19	11	7,75
<i>C. tropicalis</i>	3	3	1	2	4	2,8

Legenda: Nº IC – Número de isolados clínicos; % – Percentagem da espécie quanto ao total dos isolados

### 3.4. – Amplificação do gene *HWP1*

A amplificação do gene *HWP1* foi aplicada em todos os isolados clínicos de origem cabo-verdiana cujo resultado de identificação tenha sido *C. albicans* a fim de ser detectada a presença de

*C. africana* entre este grupo de isolados. Foram utilizados para tal os *primers* CR-f e CR-r para amplificação do gene por PCR para a distinção das espécies. Dos 29 isolados testados ficou confirmado que 13 leveduras pertenciam realmente à espécie *C. albicans*, pois apresentavam uma banda electroforética com aproximadamente 1000 pb (isolados nº101, nº102, nº105, nº107, nº108, nº110, nº111, nº114, nº117, nº 126, nº129 e nº135), enquanto quatro leveduras revelaram ser da espécie *C. africana*, cuja banda específica tem aproximadamente 700 pb (isolados nº118, nº130, nº132 e nº136). Simultaneamente, foi ainda testado um isolado da espécie *Candida dubliniensis* pertencente à colecção do laboratório de micologia do IHMT como controlo positivo para esta espécie.

Na figura 3.8 apresenta-se a imagem de um gel de agarose com alguns dos resultados obtidos após amplificação por PCR do gene *HWP1* de alguns isolados: nas *lanes* 2, 3, 5, 6, 8 e 10 observam-se bandas electroforéticas de ~1000 pb identificadoras da espécie *C. albicans* segundo Romeo e Criseo (2008), nas *lanes* 4, 7 e 9 bandas electroforéticas identificadoras da espécie *C. africana* e na *lane* 11 uma banda de ~570 pb identificadora de *C. dubliniensis*.

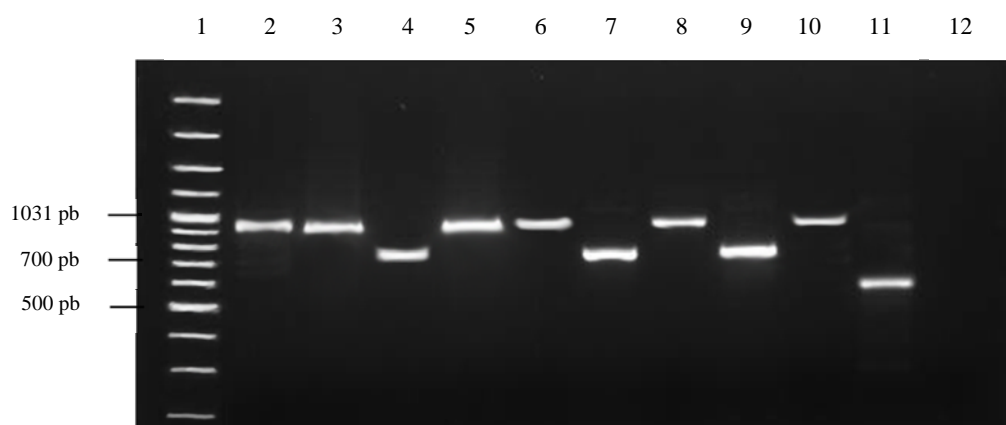


Figura 3.8 – Bandas resultantes da amplificação por PCR do gene *HWP1* dos isolados provenientes de Cabo-Verde anteriormente identificados como sendo *C. albicans*.

Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA 100 pb, 2-*C. albicans* ATCC90028, 3-*C. albicans* (nº110), 4-*C. africana* (nº130), 5-*C. albicans* (nº111), 6-*C. albicans* (nº129), 7-*C. africana* (nº132), 8-*C. albicans* (nº135), 9-*C. africana* (nº136), 10-*C. albicans* (nº101), 11-*C. dubliniensis* (IHMT 775/07) e 12-controlo negativo.

Há que realçar que, de todos os isolados testados, sete apresentaram duas bandas, uma a aproximadamente 1000 pb e outra a aproximadamente 800 pb e houve ainda seis isolados que não apresentaram qualquer banda após esta reacção de PCR para a amplificação do gene *HWP1*.

### 3.5. – Comparação de sequências do gene *ERG11*

Como este gene em *C. albicans* é demasiado extenso para ser sequenciado de uma só vez, foi necessário fragmentar em três segmentos que, no final, permitissem a reconstituição de todo o gene

dos quatro isolados. A amplificação dos 24 fragmentos amplificados por PCR (seis por isolado) foi conseguida, tendo-se revelado no entanto mais difícil a amplificação do fragmento correspondente à região central do gene *ERG11* nos isolados nº112 e 137.

Obtidas as sequências consenso (entre as sequências *forward* e *reverse* de cada fragmento) das quatro estirpes seleccionadas, estas foram comparadas a fim de serem detectadas possíveis diferenças de bases nucleotídicas, principalmente entre as sequências dos isolados sensíveis e dos isolados resistentes, que pudessem vir a ter alguma expressividade nas proteínas resultantes e uma possível relação com a sensibilidade/resistência das estirpes.

Inicialmente foi feito um alinhamento entre cada um dos 12 fragmentos obtidos e as sequências depositadas na base de dados de sequências no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pertencente ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o programa *nucleotide blast*, para confirmar se os fragmentos obtidos por amplificação pertenciam de facto ao gene *ERG11*. Deste modo, obteve-se a confirmação de que todos os fragmentos pertenciam a este gene.

Depois de realizar o alinhamento das quatro sequências consenso (um para cada isolado), foram procuradas visualmente diferenças entre os nucleótidos das sequências dos isolados sensíveis e resistentes aos antifúngicos estudados. Nos fragmentos correspondentes à primeira e segunda parte do gene foram detectadas algumas diferenças nucleotídicas entre os isolados sensíveis e resistentes. Nos terceiros segmentos não foram detectadas quaisquer diferenças nucleotídicas entre os diferentes isolados estudados. Considerámos significativas as diferenças nucleotídicas encontradas entre os dois grupos de fungos, os sensíveis e os resistentes, (tabela 3.3) desde que essas diferenças fossem partilhadas por ambas as estirpes sensíveis, e por ambas as estirpes resistentes.

Tabela 3.3 – Diferenças nucleotídicas encontradas no primeiro e segundo segmentos do gene *ERG11* entre as estirpes sensíveis e as estirpes resistentes aos antifúngicos fluconazol e voriconazol.

Gene <i>ERG11</i>						
IC nº	SA	Segmento 1				Segmento 2
		1ª diferença	2ª diferença	3ª diferença	4ª diferença	1ª diferença
28	S	nt 63 = T	nt 258 = T	nt 468 = G	nt 471 = A	nt 457 = G
137	S	nt 71 = T	nt 266 = T	nt 477 = G	nt 478 = A	nt 455 = G
59	R	nt 60 = C	nt 255 = C	nt 465 = T	nt 466 = G	nt 443 = A
112	R	nt 63 = C	nt 258 = C	nt 468 = T	nt 469 = G	nt 393 = A

Legenda: IC, Isolado clínico; SA, Sensibilidade *in vitro*; S, Sensível; R, Resistente; nt, Nucleótido.

### 3.6. - Testes de sensibilidade aos antifúngicos

#### 3.6.1. – Teste de sensibilidade *in vitro* pelo método de Kirby-Bauer aos antifúngicos convencionais

Para todos os 142 isolados incluídos neste trabalho foi estudada a sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos fluconazol e voriconazol pelo método da difusão em disco de acordo com a norma M44-A do CLSI.

Verificou-se que 85,9% dos isolados de origem portuguesa e 90,2% dos isolados de origem cabo-verdiana apresentaram sensibilidade ao fluconazol. Entre os isolados provenientes de Portugal e de Cabo-Verde somente um de cada origem apresentou uma sensibilidade ao fluconazol dependente da dose, respectivamente *C. albicans* nº87 e *C. parapsilosis* nº140. Relativamente ao voriconazol, 89,9% dos isolados provenientes de Portugal e 92,7% dos isolados provenientes de Cabo-Verde mostraram-se sensíveis a este antifúngico.

Verificou-se que em três isolados de origem portuguesa (isolados nº34, 49 e 97) que apresentaram resistência ao fluconazol, mostraram-se sensíveis ao voriconazol, sendo também os isolados nº87 e 140 sensíveis a este antifúngico. Não foi possível obter a sensibilidade de dois, isolados, um proveniente de Portugal e outro de Cabo-Verde, em virtude de não terem crescido no meio de Müller-Hinton. Cada isolado foi ainda inoculado no mesmo tipo de meio mas sem a adição de azul-de-metileno para que fosse testado se haveria sensibilidade a este composto, mas os dois isolados voltaram a não crescer. Provavelmente estas estirpes são sensíveis a algum componente deste meio de cultura preconizado pelo CLSI para esta metodologia. Ainda se pensou utilizar outro meio de cultura onde estes isolados mostraram crescer bem, como o meio de Sabouraud, mas como a técnica Kirby-Bauer está padronizada para o meio de Müller-Hinton, pensou-se que introduzir uma variável não considerada no protocolo poderia conduzir a falsos resultados, pelo que não realizou este teste com estes isolados.

Os resultados obtidos referentes aos isolados sensíveis e resistentes a cada um dos antifúngicos estudados, discriminados pelas espécies do género *Candida* testadas encontram-se representados, para o fluconazol na figura 3.9 e para o voriconazol na figura 3.10.

Na figura 3.11 e 3.12 são apresentados os resultados em termos percentuais, onde apenas não estão representados os isolados susceptíveis ao fluconazol, mas que são dependentes da dose. Nas duas figuras, cada série foi calculada tendo em conta o total de cada uma das espécies representadas no que diz respeito à sua sensibilidade ou resistência a cada um dos antifúngicos.

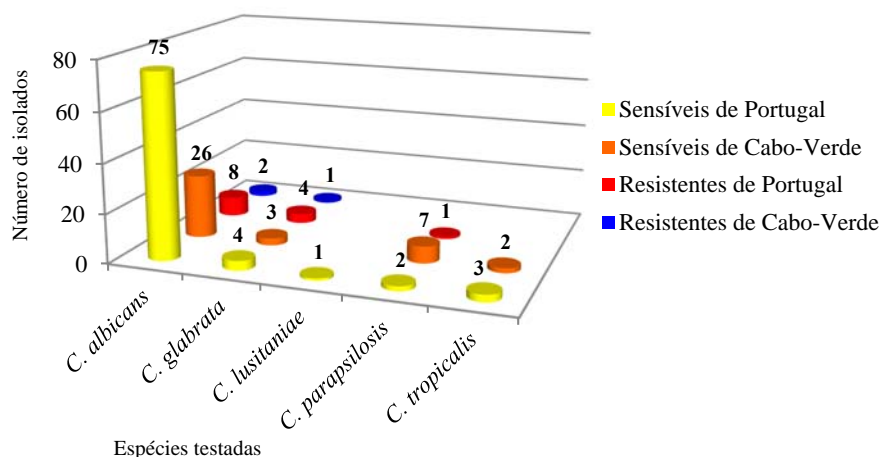


Figura 3.9 – Resultados referentes aos testes de sensibilidade ao fluconazol pelo método de Kirby-Bauer dos isolados provenientes de Portugal e Cabo-Verde, discriminados por espécie.

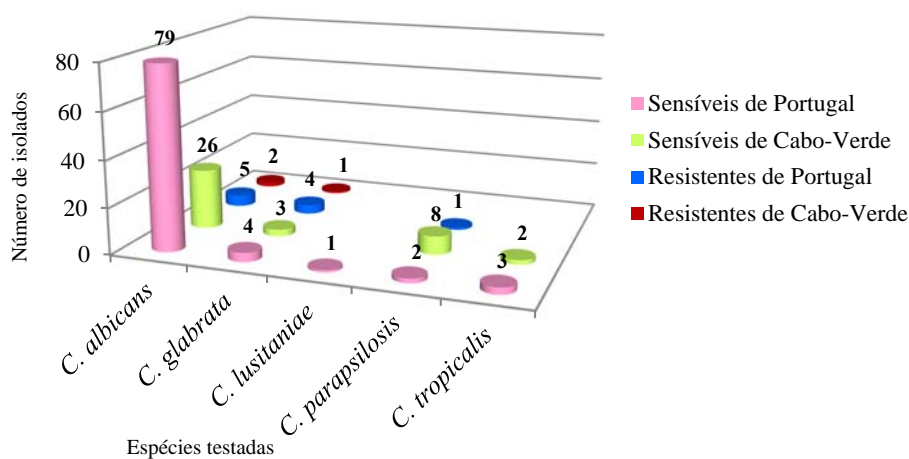


Figura 3.10 – Resultados referentes aos testes de sensibilidade ao voriconazol pelo método de Kirby-Bauer dos isolados provenientes de Portugal e de Cabo-Verde, discriminados por espécie.

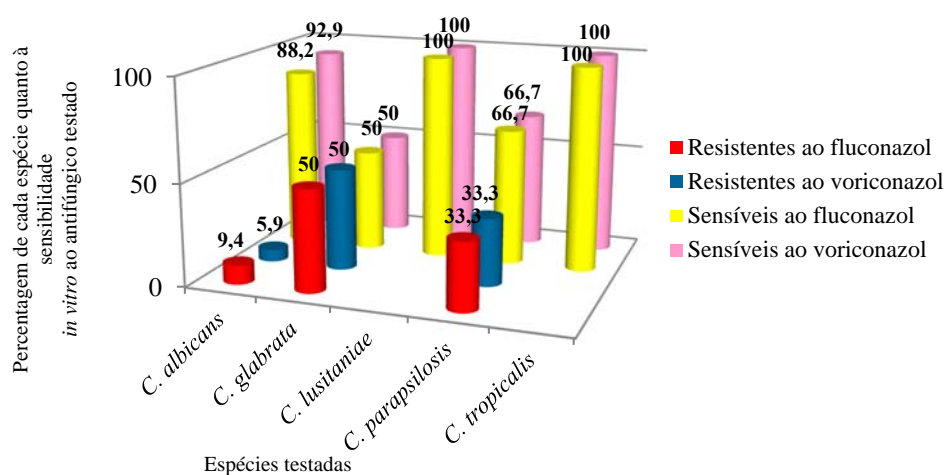


Figura 3.11 – Resultados em termos percentuais referentes aos testes de sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol pelo método de Kirby-Bauer dos isolados provenientes de Portugal, discriminados por espécie.



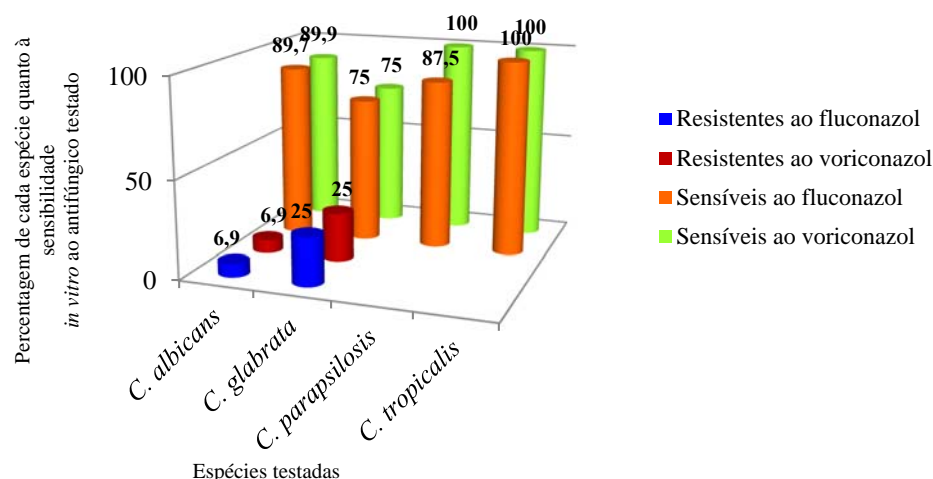


Figura 3.12 – Resultados em termos percentuais referentes aos testes de sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol pelo método de Kirby-Bauer dos isolados provenientes de Cabo-Verde discriminados por espécie.

### 3.6.2. – Teste de sensibilidade *in vitro* pelo método de Kirby-Bauer aos óleos essenciais e extracto vegetal

Para o estudo da sensibilidade aos óleos essenciais foram seleccionados três isolados clínicos de origem portuguesa e três de origem cabo-verdiana, que se tinham apresentado como resistentes no teste de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e voriconazol. Utilizou-se como controlo a estirpe de *C. albicans* ATCC 90028. Foi estudada a sensibilidade *in vitro* a três óleos essenciais (*Lavandula latifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis*) e ao extracto de grainha de toranja pelo método da difusão em disco de acordo com a norma M44-A do CLSI.

Os resultados referentes aos testes de sensibilidade realizados estão descritos no anexo 3. Os resultados estão organizados por tipo de óleo essencial e extracto e divididos por quantidade em microlitros adicionados a cada disco, sendo este aplicado depois na placa de *petri* já previamente inoculada com a amostra em estudo. Cada linha é referente a cada uma das amostras testadas e cada coluna indica a quantidade de óleo/extracto aplicada no disco e os diâmetros dos halos em milímetros.

No anexo 3 pode-se observar que todos os isolados cresceram na presença do extracto de grainha de toranja excepto o isolado 8 que apresentou halos de inibição na presença de 30 e 40  $\mu$ L de extracto. Quanto aos três óleos essenciais, todos os isolados apresentaram halos de inibição, excepto o isolado 8 que, na presença do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* não apresentou qualquer halo.

## 4 – Discussão

"A descoberta consiste em ver o que todos viram e em pensar no que ninguém pensou."

Albert Szent-Györgyi, cientista húngaro naturalizado norte-americano

Um dos principais objectivos desta tese era testar métodos de detecção e identificação moleculares de diferentes espécies de leveduras de interesse médico do género *Candida* que se mostrassem rápidos e simples, de modo a tornar a sua aplicação suficientemente prática e económica para que fosse aplicada no diagnóstico de infecções vaginais em rotina de laboratórios de microbiologia clínica, nomeadamente em laboratórios hospitalares. Pretendia-se também realizar um estudo comparativo entre estirpes provenientes de Portugal e Cabo-Verde isoladas de exsudados vaginais, verificando as diferenças ou semelhanças através da identificação convencional, molecular e sensibilidade aos antifúngicos mais utilizados no tratamento destas infecções e também em termos de algumas características das pacientes envolvidas no estudo. Outro objectivo era pesquisar a presença da espécie *C. africana* entre as leveduras isoladas e provenientes de Cabo-Verde. Pretendia-se ainda identificar possíveis diferenças no gene *ERG11* entre estirpes de *C. albicans* susceptíveis e resistentes aos antifúngicos azólicos estudados (fluconazol e voriconazol) pelo método de Kirby-Bauer, através da análise das sequências do gene *ERG11* de quatro estirpes seleccionadas (duas susceptíveis e duas resistentes, sendo um par de Portugal e outro de Cabo-Verde). Finalmente pretendia-se efectuar um estudo preliminar da sensibilidade *in vitro* aos óleos essenciais de *Lavandula latifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* e ao extracto de grainha de toranja, cujas possíveis propriedades antifúngicas já foram anteriormente referidas (Cvetni e Vladimir-Kneževi, 2004).

### 4.1. - Avaliação da população

A análise da história clínica da paciente quando esta se encontra em situação de doença pode facilitar a compreensão dos resultados obtidos em laboratório e consequentes conclusões. Assim, no presente trabalho, foram analisadas algumas informações da história clínica das pacientes envolvidas no estudo de modo a tentar compreender as causas que levaram ao desenvolvimento da infecção e possíveis condicionantes no tratamento da mesma.

À partida seria plausível supor que as duas populações estudadas poderiam apresentar diferenças, e, deste modo decidiu-se estudar tanto cada uma isoladamente, como comparando-as naqueles aspectos em que tal fosse indicado. Observando os resultados obtidos em Portugal e em

Cabo-Verde pode-se verificar que existe uma maior incidência da infecção entre os 20 e os 30 anos no caso das pacientes de Cabo-Verde (60%). Em Portugal a faixa etária entre os 30 e os 40 anos de idade (38%) é a que apresenta a maior incidência desta infecção, embora entre os 20 e os 30 anos a incidência esteja igualmente muito próxima (37%). Comparativamente, em Cabo-Verde a faixa etária entre os 30 e os 40 anos apresenta um valor de incidência desta infecção muito mais baixo (17,5%) em relação à faixa etária entre os 20 e os 30 anos (60%). Verifica-se também que no grupo etário abaixo dos 20 anos a incidência é muito próxima entre os dois países. Acima dos 40 anos, em ambos os países, a incidência decresce significativamente, atingindo valores bastante próximos (2,5% e 4%). Geralmente a menopausa chega depois dos 40 anos e, depois da entrada nesta fase, o nível de estrogénio diminui na maioria das mulheres, sendo menos comum vulvovaginites causadas por infecção por agentes patogénicos, nomeadamente por leveduras do género *Candida* (Katz, 2008).

Observando o número de isolados clínicos provenientes de Cabo-Verde e de Portugal verifica-se que de ambas as proveniências, o número de casos de infecção em mulheres grávidas é superior ao das mulheres não grávidas. Estes resultados estão de acordo com a literatura que descreve a gravidez como um factor predisponente ao aparecimento da candidíase vulvovaginal, possivelmente devido aos elevados níveis de estrogénio e glicogénio presentes nas secreções vaginais durante a gravidez, os quais são uma excelente fonte de carbono que leva ao aumento do risco desta infecção (Sobel, 2007). Sabe-se ainda que o estrogénio facilita também a adesão das leveduras às células epiteliais (Kalkanci *et al.*, 2012).

No período em que decorreu o estudo, observou-se que em Portugal um maior número de grávidas apresentou pelo menos um episódio de candidíase, quando comparadas com as pacientes de Cabo-Verde. Esta situação pode ser devida ao facto de as amostras recolhidas em Portugal terem sido provenientes da Maternidade Alfredo da Costa (MAC), instituição vocacionada para o acompanhamento de um grande número de grávidas e parturientes. Contrariamente, as amostras de Cabo-Verde provieram maioritariamente do Hospital Agostinho Neto (HAN), onde foram recolhidas amostras de exsudados vaginais de pacientes que recorreram normalmente à consulta de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital, não estando necessariamente grávidas. Por essa razão se observou que a percentagem de grávidas foi mais acentuada em Portugal do que em Cabo-Verde. No entanto é necessário ter sempre presente que a amostragem de Cabo-Verde foi mais reduzida que a de Portugal.

#### **4.2. – Métodos convencionais**

Hoje em dia, apesar do desenvolvimento e aplicação de cada vez mais diversificados métodos moleculares de identificação de microrganismos, os métodos convencionais ainda são considerados fundamentais nos laboratórios clínicos, nomeadamente em laboratórios hospitalares, por serem

comprovadamente fiáveis no diagnóstico das infecções. Em geral, os laboratórios de diagnóstico microbiológico dos hospitais preferem técnicas convencionais rápidas e de baixo custo como os meios cromogénicos e os sistemas de identificação automatizados, que ocupem minimamente o pessoal técnico.

#### 4.2.1. – Exame directo

O exame directo é uma metodologia simples, onde se observam as possíveis estruturas fúngicas presentes numa determinada preparação e que permite avaliar a presença ou não de elementos fúngicos, nomeadamente de leveduras na amostra recolhida.

Observando os resultados do exame directo descritos na figura 3.1, verificou-se que o grupo de isolados provenientes de Portugal não apresentou nenhum resultado negativo e que no caso de Cabo-Verde 82 amostras apresentaram resultado negativo. Por um lado este resultado já era espectável na medida em que as condições de cedência das amostras de cada um dos grupos, foi distinta. Em Portugal as amostras só foram entregues para a realização do presente estudo depois de ter sido previamente feita a cultura e identificação por método convencional de cada uma delas no Laboratório de Microbiologia da MAC, eliminando à partida todas as que tinham sido negativas. Em Cabo-Verde, as amostras foram recolhidas a partir de todas as pacientes com queixas clínicas que acorreram à consulta de ginecologia e obstetrícia e, imediatamente acondicionadas a 4°C para serem transportadas para Lisboa. Somente no Laboratório de Micologia do IHMT é que se realizou o seu estudo e puderam ser seleccionadas para estudo as positivas, após crescimento de colónias em cultura.

Verificou-se que 33 das amostras de origem portuguesa apresentaram filamentos septados em exame directo, ou seja, com grande probabilidade corresponderem a leveduras da espécie *C. albicans*, pois apenas esta espécie pode formar verdadeiros filamentos septados. Este resultado foi coerente com os resultados obtidos posteriormente pelo Teste da Blastese, onde se constatou que mais de 50% dos isolados formou tubo germinativo, ou seja, eram da espécie *C. albicans* ou *C. dubliniensis*. Nos exames directos das amostras provenientes de Cabo-Verde não foi possível a observação de muitas estruturas fúngicas diversificadas, sendo o mais frequente a observação de células leveduriformes isoladas ou em gemulação. No entanto, observando a percentagem de isolados que formaram tubo germinativo no Teste da Blastese, poder-se-ia esperar que se observassem mais estruturas fúngicas, nomeadamente filamentos septados, característicos de leveduras da espécie *C. albicans*. Mas é também preciso ter presente que ao preparar um exame directo, muitas vezes, o material que é colocado na lâmina para observação, ou até mesmo a zaragatoa do exsudado vaginal pode não conter todas as estruturas que se encontram no local de colonização.

Observou-se também, em certas amostras, a presença de filamentos nos quais não se detectou a presença de qualquer septo. Isto pode ter ocorrido por três razões: os filamentos poderiam ser ainda

muito jovens e ainda não ter havido a formação de septos. Outra razão prende-se ao facto de a microscopia não ser uma técnica muito sensível, o que por vezes não permite a correcta visualização de todas as estruturas fúngicas presentes. Esta situação pode também ter resultado de o KOH, utilizado na digestão da amostra não ter actuado completamente na dissociação do material biológico. De modo a contornar esta desvantagem poder-se-ia ter recorrido a outra metodologia de identificação por exame directo: a microscopia de fluorescência. Segundo Llovo e Pontón (2007), a microscopia de fluorescência permite a visualização clara e rápida das estruturas fúngicas, sendo possível apenas visualizar estas mesmas estruturas impedindo de as confundir com outros artefactos que possam estar presentes na preparação e que conduzam a resultados falsos positivos ou dificultem a visualização das estruturas de interesse.

Atendendo ao anexo 1, verifica-se que em sete amostras provenientes de Cabo-Verde (amostra nº104, nº106, nº109, nº113, nº116, nº117, nº132), cujo resultado do exame directo tinha sido negativo, passado 48 horas cresceram colónias no meio de cultura de Sabouraud com cloranfenicol. Mas o contrário não se verificou; nas amostras provenientes de Portugal, nenhuma das duas situações atrás descritas se verificou. Isto demonstra a importância da complementaridade entre o exame directo e a cultura da amostra no diagnóstico das infecções fúngicas.

Também se pode verificar que as amostras nº12, nº24, nº32, nº42 e nº67 de origem portuguesa (anexo 1) apresentaram um elevado número de células leveduriformes e filamentos septados e pseudofilamentos muito longos, reflectindo um crescimento muito exacerbado no local de infecção de onde foi recolhida a amostra. Curiosamente todas estas mesmas amostras apresentaram formação de tubo germinativo, ou seja, todas eram *C. albicans*. Podemos afirmar que nestas cinco pacientes o fungo que estava a provocar a infecção era a levedura da espécie *C. albicans* e que esta espécie, para além de formar verdadeiros filamentos, também facilmente pode formar pseudofilamentos *in vivo*.

Por outro lado na amostra nº121 de origem cabo-verdiana (anexo 1), em exame directo, apenas se observou um grande número de bactérias e um número reduzido de células leveduriformes. O isolamento e separação das leveduras desta amostra em relação à grande quantidade de bactérias presentes foi difícil e moroso, sendo apenas possível separar os microrganismos em meio Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol® (BioMérieux, França), onde mesmo assim ainda se observou algum crescimento bacteriano. Observando os registos sobre a sintomatologia da doente, pode-se afirmar que muito provavelmente este caso se tratava de uma infecção mista, uma vaginite bacteriana associada a uma colonização fúngica e, muito provavelmente, não uma infecção fúngica por causa da diferença de número dos microrganismos.

Tendo em conta os diversos resultados obtidos pela observação em exame directo pode-se constatar que este é na realidade muito importante para avaliar a extensão de uma infecção fúngica

vaginal. A observação de um elevado número de filamentos, pseudofilamentos e de células leveduriformes em gemulação corresponde em geral a infecções mais graves, em que a presença de filamentos indica que já ocorreu invasão dos tecidos da mucosa por parte da levedura.

Contrariamente um baixo número de células leveduriformes isoladas ou em gemulação e em pequeno número, geralmente corresponde a uma simples colonização em que as leveduras se podem encontrar em situação comensal, ou seja, sem causar infecção. No entanto, pode igualmente corresponder ao início de uma infecção fúngica ou a uma metodologia de recolha menos adequada.

#### 4.2.2. – Teste da Blastese

Observando agora os resultados obtidos no Teste da Blastese pode-se verificar que houve uma maior percentagem de isolados clínicos provenientes de Portugal a formarem tubo germinativo comparando com os de Cabo-Verde. A diferença não foi muito grande, mais ainda assim a diferença foi significativa entre os dois grupos.

Cruzando os resultados do Teste da Blastese dos isolados de origem portuguesa com os resultados obtidos por identificação molecular através de técnica do PCR multiplex verifica-se que em 32% dos isolados (32/100) para os quais se obteve resultado negativo no primeiro, 17 revelaram ser *C. albicans* no segundo. De acordo com a literatura 5 % das leveduras *C. albicans* podem não formar tubo germinativo (Kwon-Chung e Bennett, 1992), o que não coincide com os nossos resultados obtidos nos isolados de origem Portuguesa, pois neste caso 20,0% das leveduras *C. albicans* estudadas neste trabalho não formaram tubo germinativo. O mesmo se verificou nos isolados de origem cabo-verdiana onde 45,2% (19/42) dos isolados que não formaram tubo germinativo, 6 pertenciam à espécie *C. albicans*, correspondendo a 20,7% do total da espécie *C. albicans*. É curioso que a percentagem de isolados que não formam tubo germinativo foi muito semelhante nos dois grupos de isolados de diferentes origens apesar das diferentes dimensões das amostragens. De facto de, nestes últimos anos, tem-se verificado que os isolados clínicos de *C. albicans* têm vindo a revelar cada vez mais, uma menor de capacidade de filamentar no Teste da Blastese, obrigando a utilizar outras metodologias na sua identificação. Este facto parece-se prender com uma possível acção de fármacos anteriormente prescritos às doentes que influam na perda de capacidade das leveduras produzirem filamentos (Pereira, 2010).

Verificou-se também que um isolado proveniente de Portugal cujo resultado de Teste da Blastese foi positivo, revelou posteriormente, por identificação molecular, ser *C. tropicalis*. Foi um falso-positivo no Teste da Blastese. Na verdade está descrito que podem ocorrer falsos positivos para espécies de *Candida* não-*albicans*, nomeadamente com *C. tropicalis*. Esta espécie pode formar facilmente pseudofilamentos morfológicamente muito semelhantes a tubos germinativos,

principalmente após incubações prolongadas, pelo que o tempo de incubação de 2h30min nunca deverá ser ultrapassado (Nova, 2006), para que se obtenham resultados válidos.

#### 4.2.3. – Métodos bioquímicos de identificação de leveduras

A identificação bioquímica foi aplicada a oito isolados de origem portuguesa e a um isolado de origem cabo-verdiana cujas identificações moleculares não foram possíveis de se obter tanto através do método de PCR multiplex como por PCR-RFLP. A identificação bioquímica foi também aplicada a todos os isolados cuja identificação molecular foi *Candida* não-*albicans* pois aquela ainda consiste no método *gold-standard* de identificação nos laboratórios de Micologia Médica. No grupo de isolados cuja identificação molecular prévia já havia sido obtida destacaram-se seis isolados (dois de origem portuguesa e quatro de origem cabo-verdiana) onde a identificação molecular e convencional não foram concordantes na identificação da espécie *Candida* não-*albicans*.

Houve também um isolado de origem cabo-verdiana cujo resultado por identificação molecular havia sido *C. glabrata* mas que demonstrou ser, por identificação bioquímica, uma mistura de duas espécies diferentes: *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*. Neste caso não se conseguiu identificar qual era o principal agente causador da infecção, se os dois estavam envolvidos na infecção, ou se um deles era comensal e o outro estava a causar infecção.

Estes resultados demonstram a importância da identificação bioquímica, que apesar de em alguns casos não coincidir com os resultados obtidos por identificação molecular, permite também a identificação de possíveis espécies patogénicas do género *Candida* que não conseguem ser identificadas pelos métodos moleculares, pois apenas existe um número restrito de *primers* específicos para as espécies do género *Candida* mais frequentes nas infecções vaginais.

Num trabalho realizado por Liguori *et al.* (2010) onde foi comparada a identificação de *C. albicans* por métodos convencionais e o método de identificação molecular PCR multiplex, os resultados obtidos em termos de identificação convencional apresentaram bons níveis de especificidade e sensibilidade em relação ao PCR multiplex. No entanto os autores apontaram que os métodos de identificação molecular ainda não entraram na rotina dos laboratórios clínicos devido ao alto investimento inicial que é necessário e à necessidade de se dispor de pessoal técnico especializado nesta área (Liguori *et al.*, 2010).

O método de identificação ID32C<sup>®</sup> revelou-se muito satisfatório sendo exequível e aplicável na maioria dos laboratórios. No entanto apresenta a desvantagem de ser demorado, (só se obtém o resultado de identificação ao fim de 48-72 horas) e de certa forma é um tanto dispendioso (os kits ID 32C<sup>®</sup> com 25 testes custam actualmente 232,17 €). No entanto esta desvantagem é amplamente



compensada com a precisão de identificação das leveduras do género *Candida* até à espécie, o que é um factor crucial na escolha da melhor terapêutica para o tratamento da infecção (Nova, 2006).

#### 4.3. - Métodos de identificação molecular

A identificação através de métodos moleculares tem sido desenvolvida em grande escala nas últimas décadas. As inúmeras opções hoje em dia disponíveis para diagnóstico molecular permitem a obtenção de resultados de forma cada vez mais rápida e eficaz. Todavia, é necessário averiguar se essas técnicas são susceptíveis de ser aplicadas e exequíveis em rotina de laboratórios de microbiologia clínica, nomeadamente laboratórios hospitalares.

Foi feita identificação molecular de todos os isolados incluídos neste estudo de modo a confirmar e averiguar os resultados obtidos através do Teste da Blastese. Verificou-se que em 83% (83/100) dos isolados de origem portuguesa e em 83,3% (35/42) dos isolados de origem cabo-verdiana, as identificações pelo Teste da Blastese e pelo método molecular coincidiram. A percentagem é elevada e, comparando os resultados obtidos entre os isolados dos dois países, não foi muito diferente.

Os métodos de identificação utilizados tanto na MAC como no HAN são métodos convencionais, como os meios de CHROMagar e meio de Sabouraud simples, respectivamente. Comparando os resultados obtidos em cada uma das instituições com os resultados obtidos por identificação molecular no Laboratório de Micologia do IHMT., observa-se que em 11% dos casos nos isolados clínicos de origem portuguesa os resultados entre a identificação com meio de CHROMagar e a molecular não coincidiram. No caso dos isolados de Cabo-Verde 32,3% (10/31) dos isolados provenientes do HAN que vinham como negativos mostraram não ser e, relativamente aos restantes apenas foi possível obter a identificação ao nível do tipo de microrganismos ou ao nível do género.

No primeiro caso a diferença não foi muito significativa, mas no segundo caso além dos 32,3 % que foram considerados erradamente negativos, nos restantes isolados não tinha sido possível obter uma identificação ao nível da espécie. Estes resultados reflectem a metodologia utilizada na instituição cabo-verdiana. Devido aos poucos recursos disponíveis, apenas é utilizado o meio de Sabouraud simples, sem antibióticos, para o desenvolvimento das colónias e, principalmente devido à falta de espaço, de pessoal e à grande afluência de amostras diariamente no laboratório, o tempo que é permitido para o crescimento das culturas é de apenas 48 horas. No caso dos fungos, 48 horas é o tempo mínimo de incubação de amostras de exsudados vaginais com suspeita de candidíase a crescer em cultura, mas é frequentemente insuficiente. Desse modo, os 32,3% de resultados negativos estiveram naturalmente associados a um tempo demasiado curto de incubação daquele requerido para o crescimento das leveduras, como veio a ser comprovado posteriormente após o estudo das mesmas



amostras no IHMT em Lisboa. Por outro lado a maioria dos resultados é apresentada como sendo apenas levedura após observação visual macroscópica da morfologia das colónias nas placas de *petri*, não sendo feita qualquer identificação da espécie causadora de infecção. Do centro reprodutivo da Fazenda não foi fornecida qualquer informação prévia sobre as amostras, pois apenas foram realizadas colheitas, tendo sido apenas feito o diagnóstico clínico na delegacia da Cidade da Praia.

Nalguns casos da MAC e especialmente no HAN, a identificação convencional utilizada não permite a correcta identificação dos isolados ao nível da espécie. Este facto é muito importante para a escolha da melhor terapêutica a prescrever, isto porque diferentes espécies fúngicas têm diferentes susceptibilidades aos fármacos antifúngicos utilizados. Uma correcta escolha da terapêutica diminuirá a possibilidade do aparecimento de resistências, permitindo também um tratamento mais eficaz e rápido da doente.

Num estudo efectuado por Rad *et al.* (2012), onde foi utilizada a técnica do PCR multiplex na identificação de 191 isolados clínicos, 65,1% eram *C. albicans*, 13,1% *C. glabrata*, 6,2% *C. tropicalis*, 4% *Candida krusei*, 0,6% *C. guilliermondii* e 0,6% *C. parapsilosis*, tendo os autores identificado também algumas infecções mistas. De acordo com os resultados apresentados neste estudo, *C. albicans* continua a ser a espécie patogénica mais comum nas infecções por *Candida* spp. seguida de *C. glabrata*. Estes autores comprovaram também que a técnica de PCR multiplex torna-se uma técnica rentável, rápida e económica pois só requer os componentes básicos para as reacções de PCR e o kit comercial de extracção de DNA. No entanto, comparativamente ao nosso trabalho, nesse estudo tem de ser feita a extracção de DNA, o que torna a técnica um pouco mais demorada, trabalhosa e dispendiosa.

Num outro estudo realizado por Mirhendi *et al.* (2006), onde foi utilizada como técnica de identificação o PCR-RFLP, foram identificados 137 isolados clínicos: 93 (67,9%) pertenciam à espécie *C. albicans* e/ou *C. dubliniensis*, 12 (8,8%) à espécie *C. tropicalis*, 12 (8,8%) à espécie *C. parapsilosis*, 9 (6,6%) a espécie *C. glabrata*, 7 (5,1%) à espécie *C. krusei* e 4 (2,9%) à espécie *C. guilliermondii*. Estes autores apresentaram a técnica de PCR-RFLP como uma técnica simples, rápida e económica de identificação que pode ser aplicada em laboratórios clínicos. No entanto a digestão pela enzima *Msp1* não permite distinguir entre as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, e mais uma vez, exige que se extraia o DNA das leveduras a partir das culturas.

Zomorodian *et al.* (2011) utilizaram também a técnica de PCR-RFLP, tendo identificado entre 206 isolados de levedura, 93 (45,1%) *C. albicans*, 42 (20,4%) *C. glabrata*, 26 (12,6%) *C. parapsilosis* e 25 (12,1%) *C. tropicalis*.

Carvalho *et al.* (2007) apresentaram também a técnica de PCR multiplex como uma metodologia simples, rápida e económica. Obtendo a identificação de 231 isolados clínicos de

leveduras (90 *Candida albicans*, 61 *C. parapsilosis*, 25 *C. tropicalis*, 19 *C. krusei*, 18 *C. glabrata*, 13 *C. guilliermondii* e 5 *C. lusitaniae*) e de 8 estirpes de referência incluindo *C. dubliniensis* ATCC MYA-646, demonstram que esta técnica permite em relação ao PCR-RFLP com utilização da enzima de restrição *Msp*I, a identificação da espécie *C. dubliniensis* que não é possível na primeira técnica. Referem ainda que pode ser testada em vários tipos de amostras incluindo hemoculturas e amostras de urina e apresenta boa reprodutibilidade com diferentes ciclos de PCR e em diferentes laboratórios.

A identificação de leveduras do género *Candida* através do método de PCR multiplex descrito por Carvalho *et al.* (2007), e utilizada no presente trabalho, mostrou ser uma metodologia rápida e simples de aplicar. Apresentou como principais vantagens:

- ◆ Obter o DNA para a reacção, directamente a partir da cultura de levedura sem ser necessário realizar a extracção prévia do DNA. Assim é eliminada a possibilidade de contaminação do DNA que pode ocorrer durante o passo de extracção, e poupa-se em tempo e reagentes.
- ◆ Identificar simultaneamente oito espécies (as mais frequentes em infecções por *Candida*) na medida em que está incluído no multiplex um *primer* específico para cada uma delas.

Assim o processo de identificação torna-se mais rápido, eficaz e menos trabalhoso, factores de grande importância para os laboratórios hospitalares.

A interpretação dos resultados desta metodologia também é fácil pois para cada espécie se obtêm apenas duas bandas as quais possuem dimensões bastante diferentes entre as diferentes espécies, permitindo distingui-las visualmente com facilidade.

Por outro lado esta técnica requer a aquisição inicial de alguma destreza pois a quantificação de DNA necessária para a reacção de PCR não é rigorosamente mensurável. Com a ponta de um palito esterilizado é retirada uma quantidade quase imperceptível que, se for demasiada, inibe a reacção de amplificação e, se for insuficiente, não fornece DNA suficiente para que ocorra amplificação. Também é preciso ter sempre presente que apenas é possível realizar a identificação de leveduras para as quais existe um *primer* específico na *mix* de *primers* do multiplex.

Consequentemente, a técnica de RFLP demonstrou ser igualmente vantajosa pois complementou a identificação de alguns dos isolados clínicos que não havia sido possível identificar por PCR multiplex, mesmo após várias tentativas. Tal como o PCR multiplex, é uma técnica simples e prática, identificando as mesmas espécies patogénicas e tendo a vantagem de a quantificação do DNA ser mais precisa. No entanto apresenta a desvantagem de ser necessária a extracção prévia deste. Por outro lado também é uma técnica mais demorada na medida em que são necessários vários passos fundamentais: extracção de DNA, amplificação da região ITS do rDNA por PCR, electroforese para confirmação dessa amplificação, digestão do fragmento amplificado com a enzima *Msp*I e uma

segunda electroforese para detecção dos fragmentos de restrição, o que atrasa e onera substancialmente a obtenção dos resultados.

Em ambas as técnicas é necessário um investimento inicial para a obtenção dos equipamentos básicos (termociclador, tina de electroforese e transiluminador). Cabe então a cada laboratório decidir o que é mais vantajoso (Liguori *et al.*, 2010).

#### 4.4. – Ocorrência das espécies de *Candida* nos dois locais estudados

Fazendo uma comparação em termos das espécies do género *Candida* que foram identificadas nos dois grupos de isolados, verifica-se que em ambos os grupos a espécie prevalente é *C. albicans*. Quanto às espécies *Candida* não-*albicans* existe uma diferença entre os dois países. No caso de Portugal a segunda espécie mais comum é *C. glabrata* com uma percentagem de 8%. Em Cabo-Verde a segunda espécie mais frequente é *C. parapsilosis* apresentando uma percentagem de 19%.

Quanto às restantes espécies não-*albicans*, em Portugal *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentam a mesma prevalência (3%). No caso de Cabo-Verde, *C. glabrata* apresenta uma prevalência de 10% enquanto que *C. tropicalis* está presente apenas em 2% dos isolados. Entre os isolados portugueses encontrou-se ainda um isolado *C. lusitaniae* (0,7%).

Num estudo realizado por Wei *et al.* (2010), que tinha como objectivo estudar dois grupos étnicos distintos que vivessem na mesma região da China sem queixas de infecção vaginal, quanto à diversidade de espécies do género *Candida*. Dos 1006 isolados das *Han Chinese*, 77,14% eram *C. albicans*, 10,74% *C. glabrata*, 4,78% *C. tropicalis* e 2,98% *C. parapsilosis*. Por outro lado, dos 1102 isolados das *Tibetan woman*, 89,63% eram *C. albicans*, 3,70% *C. glabrata*, 3,33% *C. tropicalis* e 1,48% *C. parapsilosis*. Os autores referem que os dois grupos estudados eram originários da mesma região geográfica e viviam nas mesmas condições climáticas e apontam que as diferenças que se verificam nas espécies isoladas do género *Candida* estão muito provavelmente associadas às diferenças culturais. A cultura e etnia das pacientes influenciam a sua dieta, a sua higiene e por vezes o recurso à medicina actual, entre outros factores. Por exemplo, as mulheres tibetanas raramente fazem lavagens vaginais ou usam antibióticos, dois factores que afectam a população bacteriana e fúngica saprófita da vagina. Verificaram, tal como no presente estudo, que a espécie *C. albicans* era a mais frequente, aparecendo as espécies *C. glabrata* e *C. tropicalis* com as espécies não-*albicans* mais frequentes. Apontaram também que esta avaliação da distribuição das populações de leveduras do género *Candida* na flora vaginal de pacientes sem sintomatologia de infecção fúngica pode orientar o diagnóstico em condições patológicas e pode ser utilizado na monitorização de infecções emergentes e resistência às drogas.

Um estudo desenvolvido na Turquia por Kalkanci *et al.* (2012) que envolveu a identificação de 207 leveduras provenientes de infecções vaginais, mostrou que a espécie *C. albicans* era a espécie mais comum (59,9%) tal como no presente trabalho, apesar de no caso de Portugal e Cabo-Verde, a percentagem ser de 85% e 69%, respectivamente. Quanto à segunda espécie mais frequente, *C. glabrata*, este estudo está em concordância com os resultados obtidos em Portugal (8%).

Um outro estudo desenvolvido na Austrália por Pirotta e Garland (2006) apresenta resultados também concordantes com o presente estudo, descrevendo a espécie *C. albicans* como a espécie mais frequente e *C. glabrata* como a segunda mais frequente.

Os resultados obtidos quando à espécie *C. parapsilosis* em Cabo-Verde diferem dos observados normalmente na literatura. Assim procurou-se também comparar com trabalhos desenvolvidos com amostras provenientes de África. Num estudo desenvolvido por Namkinga *et al.* (2005), cujos isolados provinham da República Unida da Tanzânia, verificou-se que *C. tropicalis* era a segunda espécie mais frequentemente encontrada em isolados de candidíase. Por sua vez, Pfaller *et al.* (2010) também apresenta *C. glabrata* como a segunda espécie mais frequente em isolados provenientes de África. O continente africano possui uma grande extensão e as diferenças climáticas e culturais são enormes de país para país, daí não seja estranho haver diferenças em termos da incidência das várias espécies do género *Candida*.

Já num estudo português, realizado por Costa-de-Oliveira *et al.* (2008) apresenta a *C. parapsilosis* como a segunda espécie mais frequente, no entanto os isolados estudados foram obtidos a partir de hemoculturas e não de exsudados vaginais.

#### **4.5. – Amplificação do gene *HWP1***

São ainda poucos os estudos desenvolvidos sobre *C. africana*, especialmente utilizando técnicas de identificação moleculares. Pouco se sabe sobre a sua epidemiologia ou se está mais associada a casos agudos ou recorrentes de candidíase (Gumral *et al.*, 2011).

A pesquisa de *C. africana* foi feita apenas nos isolados provenientes de Cabo-Verde pois segundo a literatura, com mais probabilidade se encontrariam isolados de *C. africana* em amostras provenientes de África, neste caso de Cabo-Verde.

Observando os resultados obtidos, verifica-se que nos 29 isolados identificados, o número de *C. albicans* foi superior ao de *C. africana* numa proporção de 12:4. No entanto, sete dos 29 isolados apresentaram duas bandas e seis não apresentaram qualquer banda.

Num trabalho realizado em 2001 por Tietz *et al.* identificaram dois isolados atípicos de *C. albicans* utilizando métodos convencionais (Teste da Blastese e observação da formação de clamidósporos em meio *corn-meal agar*). Este grupo verificou que esses isolados formavam tubo germinativo como *C. albicans* mas não produziam clamidósporos em meio *corn-meal agar*. Propuseram então uma nova designação destes isolados atípicos: *C. africana*.

Devido ao facto de *C. albicans* e *C. africana* apresentarem uma semelhança genética de quase 100% (Alonso-Vargas *et al.*, 2008), os métodos usualmente empregues para diagnóstico de espécies do género *Candida* não conseguem distingui-las.

Romeo e Criseo (2008) através da amplificação do gene *HWP1* distinguiram molecularmente *C. albicans* de *C. africana*. Neste trabalho foram identificados dois isolados clínicos como *C. africana*, ambos obtidos através de exsudados vaginais, seis isolados *C. albicans* provenientes de diferentes tipos de amostras e quatro isolados da espécie *C. dubliniensis* obtidos de exsudados bucais.

Os autores indicaram que a utilização de um único par de *primers* permite a amplificação de uma banda, na medida em que tem de ser detectada uma banda electroforética em todos os casos, e não se referem à possibilidade de surgirem falsos negativos. No entanto no nosso estudo, seis dos isolados não apresentaram qualquer banda e o aparecimento de duas bandas em sete dos 30 isolados também não coincidem com as indicações de Romeo e Criseo (2008).

Noutro estudo desenvolvido na Turquia por Gumral *et al.* (2011) foi investigada a presença de *C. africana* e *C. dubliniensis*, onde em 195 isolados de *C. albicans* provenientes de exsudados vaginais não foi encontrado nenhum isolado de qualquer uma das espécies propostas para pesquisa. No entanto os autores alertam para a importância dos métodos convencionais automatizados não distinguirem *C. albicans* de *C. africana* levando a uma identificação incorrecta.

Contrariamente, num estudo desenvolvido na Nigéria, onde foram avaliados 84 isolados de espécie *C. albicans*, identificaram-se dois isolados como sendo *C. africana* (Nnadi *et al.*, 2012).

Também em 2012, Dieng *et al.* isolaram no Senegal, a partir de 150 isolados de *C. albicans* provenientes principalmente de exsudados vaginais, três isolados *C. africana*.

Curiosamente, num estudo recente desenvolvido por Romeo e Criseo (2009) na Itália com isolados provenientes de amostras recolhidas em hospitais italianos foram identificadas 27 isolados clínicos de *C. africana*. Estes autores declararam que todos os isolados de *C. africana* provinham de exsudados vaginais e que através do sistema de identificação convencional utilizado não foi possível diferenciá-los de *C. albicans*, levando a identificações incorrectas. No presente estudo, tanto as técnicas convencionais, como as moleculares utilizadas também não diferenciaram os quatro isolados de *C. africana* existentes, da espécie *C. albicans*.

É de realçar ainda, que de todos os estudos acima referidos realizados em África, o número de isolados *C. albicans* testado foi muito superior ao testado no nosso trabalho e o número de isolados de *C. africana* encontrados foi inferior. Apenas se verificou um número de isolados superior no estudo desenvolvido na Itália, mas não é referido no artigo se estes isolados provinham de pacientes africanas. Dado a percentagem de *C. africana* encontrada no nosso trabalho ter sido elevada comparativamente aos outros trabalhos, sugerimos que se alargue o estudo a um maior número de isolados clínicos a fim de confirmar se existe realmente uma grande prevalência de *C. africana* entre a população cabo-verdiana.

#### 4.6. – Sequenciação do gene *ERG11*

São diversos os mecanismos de resistência aos azóis mostrados pelas leveduras do género *Candida* (Manoharlal, 2008; Sanglard *et al.*, 2009; Pfaller, 2012) e torna-se urgente entender esses mecanismos de acção de forma a encontrar novos caminhos de combate à resistência e tentar evitar o aparecimento de novos mecanismos.

Com o intuito de encontrar diferenças entre estirpes *C. albicans* susceptíveis e resistentes aos azóis (fluconazol e voriconazol) procedeu-se à sequenciação do gene *ERG11*, um dos genes responsáveis por essa resistência (Xu *et al.*, 2008; Morio *et al.*, 2010). Foram seleccionadas quatro estirpes de *C. albicans*, duas de isolados provenientes de Portugal e duas de isolados de Cabo-Verde onde previamente havia sido determinada a sensibilidade vs resistência *in vitro* aos dois antifúngicos testados neste trabalho. De cada origem, uma das estirpes era resistente ao antifúngico fluconazol e a outra susceptível a ambos os antifúngicos.

Ao analisar a tabela 3.3 obtida depois do alinhamento entre os vários fragmentos das diferentes partes do gene, verificaram-se diferenças apenas nos fragmentos correspondentes à primeira e segunda parte do gene *ERG11*. Na primeira parte observaram-se três pontos que diferenciavam os isolados sensíveis dos resistentes em termos de bases nucleotídicas. No primeiro ponto e no segundo ponto os isolados sensíveis apresentaram a base citosina e os resistentes a base timina. No terceiro ponto, nos isolados sensíveis encontrava-se uma guanina e nos isolados resistentes uma timina e no quarto ponto nos isolados sensíveis figurava uma adenina e nos isolados resistentes uma guanina.

Na segunda parte do gene apenas se verificou uma diferença quanto às bases nucleotídicas, aparecendo nos isolados sensíveis uma guanina e nos resistentes uma adenina.

A observação e comparação visual e consequente diferença entre sensíveis e resistentes não é suficiente para afirmar que ocorreram mutações no gene *ERG11* ou que a resistência observada nos isolados 59 e 112 foi devida a alterações no gene *ERG11*. Para averiguar este facto seria necessário

realizar um estudo mais aprofundado quanto à identificação de mutações e consequente alteração na proteína resultante.

Por outro lado a dificuldade que se apresentou na amplificação do fragmento correspondente à segunda parte no gene nos isolados nº112 e 137 pode ter acontecido, por exemplo, devido a uma especificidade menor por parte dos *primers* *ERG11Sec2A* e *ERG11Sec2B* ou a uma concentração de *primer* superior à necessária, dificultando assim a amplificação dos fragmentos.

#### 4.7. – Testes de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos

Devido ao aumento no número de infecções fúngicas, nomeadamente infecções fúngicas vaginais, e à diversificada lista de antifúngicos disponíveis para o tratamento, os testes de sensibilidade aos antifúngicos têm ganho maior reconhecimento (Sheehan *et al.*, 2006; Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008). Hoje em dia, os testes de sensibilidade aos antifúngicos têm vindo a ajudar os médicos na selecção da terapia antifúngica mais adequada (Sheehan *et al.*, 2006), havendo neste momento dois métodos para testar *in vitro* a sensibilidade aos fármacos antifúngicos: o método de Kirby-Bauer e o método da microdiluição, ambos padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

##### 4.7.1. – Testes de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos convencionais pelo método de Kirby-Bauer

O método de Kirby-Bauer apresenta-se como um método rápido, muito simples e económico que permite obter resultados de sensibilidade em 24 horas (Sheehan *et al.*, 2006) sendo um dos métodos de eleição nos laboratórios de microbiologia clínica, nomeadamente laboratórios hospitalares.

A escolha de uma terapêutica antifúngica adequada é um passo crucial no tratamento de infecções fúngicas, e é necessário ter sempre em consideração não só a espécie fúngica patogénica como também as características intrínsecas da paciente. Existem diversos grupos de antifúngicos utilizados mas a maioria dos casos de candidíase vaginal pode ser tratada com sucesso através da utilização do fluconazol (Ruhnke *et al.*, 2011). No entanto é preciso ter presente que algumas espécies do género *Candida* como *C. glabrata* apresentam frequentemente baixa ou total ausência de sensibilidade ao fluconazol (Denning e Hope, 2010).

De uma forma geral, os isolados do presente trabalho apresentaram uma elevada sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol, apresentando no entanto uma sensibilidade ligeiramente inferior ao fluconazol quando comparado com o voriconazol.



Mais especificamente, os isolados provenientes de Portugal mostraram ser menos sensíveis ao fluconazol do que os de Cabo-Verde. Isto pode explicar-se tendo em conta o tipo de terapêutica utilizada nos dois países. Enquanto que na MAC os antifúngicos administrados no tratamento das infecções se baseiam essencialmente na administração de fluconazol, os utilizados tanto no HAN como no Centro Reprodutivo da Fazenda baseiam-se na prescrição de clotrimazol, recorrendo, nas duas instituições cabo-verdianas, apenas à utilização de fluconazol nos casos de candidíase recorrente. Consequentemente, este facto explica a ocorrência de apenas três casos de resistência ao fluconazol entre os isolados cabo-verdianos.

Tendo em conta as espécies encontradas em cada país e observando as figuras 3.9 e 3.11, verificou-se que para os isolados de Portugal o fluconazol foi mais eficiente nas espécies *C. albicans* (88,7%), *C. lusitaniae* (100%) e *C. tropicalis* (100%) verificando-se um decréscimo de sensibilidade nas espécies *C. parapsilosis* (66,7%) e *C. glabrata* (50%).

Nos isolados de Cabo-Verde, tendo em conta as figuras 3.9 e 3.12, verificou-se que também nas espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* o fluconazol se mostrou mais eficiente, notando-se no entanto que em Cabo-Verde a eficiência do fluconazol foi superior para a espécie *C. parapsilosis*, sendo 87,5% dos isolados sensíveis a este fármaco. A espécie *C. glabrata* mostrou-se novamente menos sensível ao fluconazol mas o quadro já foi um pouco diferente verificando-se uma percentagem de isolados sensível superior aos resistentes.

Já em relação à sensibilidade demonstrada ao voriconazol pelos dois grupos de isolados, em geral houve uma eficácia superior em relação ao fluconazol, observando-se no entanto que a acção antifúngica nos isolados portugueses ainda assim foi menor do que nos de Cabo-Verde tal como se verificou anteriormente em relação ao fluconazol.

Tendo em conta os isolados resistentes no caso de Portugal, a percentagem de estirpes que apresentou resistência ao fluconazol foi superior em relação ao voriconazol. Três isolados mostraram ser resistentes ao fluconazol mas susceptíveis ao voriconazol, e 10 isolados mostraram ser resistentes a ambos os antifúngicos.

Nos isolados provenientes de Cabo-Verde a percentagem de isolados resistentes foi a mesma em relação aos dois antifúngicos, havendo três casos de resistência a ambos os antifúngicos e o caso do isolado nº140 que se apresentou sensível dependente da dose ao fluconazol mas sensível ao voriconazol.

Num estudo realizado por Zomorodian *et al.* (2011) num total de 206 isolados *Candida* spp. 46,5% dos isolados de *C. albicans* apresentaram sensibilidade ao fluconazol. Nos isolados de *C. glabrata*, 90,5% apresentaram sensibilidade enquanto que 9,5% foram resistentes. Dos 26 isolados de



*C. parapsilosis*, 96,2% mostraram-se sensíveis e 3,8% foram resistentes. Por fim nos 25 isolados de *C. tropicalis*, 96,0% apresentaram sensibilidade contra 4,0% que mostraram ser resistentes. Tal como o presente estudo, todas as espécies testadas apresentaram sensibilidade ao fluconazol apesar de o número de resistentes tendo em conta o total de espécies encontrados em Portugal ser superior ao deste estudo, o que já não se verificou em Cabo-Verde. No entanto o resultado obtido por Zomorodian *et al.* (2011) para a sensibilidade ao fluconazol na espécie *C. albicans* não está muito de acordo com o que tem vindo a ser descrito na literatura, pois menos de 50% dos isolados estudados neste trabalho apresentam sensibilidade a este antifúngico. Esta situação reforça a importância e necessidade de realizar testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos das leveduras do género *Candida*, pois nem sempre uma amostra isolada segue um padrão que se considera geral (Benedetti *et al.*, 2011).

Pfaller *et al.* (2010) estudaram um total de 9744 isolados em que foi testada a sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol e declararam que o fluconazol foi mais eficiente (valores de sensibilidade >90%) contra as espécies *C. albicans* (98,0%), *C. parapsilosis* (93,2%), *C. tropicalis* (91,0%) e *C. lusitaniae* (92,1%) apresentando um decréscimo de acção antifúngica (valores de sensibilidade <75%) na espécie *C. glabrata*. Verificaram também que o voriconazol foi mais eficiente que o fluconazol contra a maioria das espécies do género *Candida* exceptuando o caso da espécie *C. tropicalis* que apresentou 91% de sensibilidade ao fluconazol e 89,5% ao voriconazol.

Tendo em conta os resultados obtidos no presente trabalho, denota-se que é necessária uma vigilância periódica e constante da susceptibilidade das leveduras do género *Candida* ao fluconazol, devido à crescente utilização deste fármaco no tratamento empírico das infecções (Pereira, 2010), evitando assim o aparecimento de resistências mais difíceis de controlar.

No entanto a resistência pode não ser apenas causada pela escolha inadequada da terapêutica, mas também possivelmente por uma toma desajustada por parte da doente. Podem ocorrer dois tipos de situações: uma subdosagem de antifúngico ou uma insuficiência terapêutica. No primeiro caso a doente pode respeitar o tempo de toma mas não a dosagem recomendada pelo médico. No segundo caso a doente deixa de sentir os sintomas da infecção e abandona o tratamento antes do tempo necessário para o completo controlo da infecção. Pelo facto desta não ficar completamente curada, há uma forte probabilidade que ocorra reinfeção, e muitas das vezes a doente em vez de recorrer novamente ao médico retoma, por sua auto iniciativa, a toma de antifúngico. Estas duas situações estimulam igualmente o aparecimento de resistências.

Quando às terapêuticas em que se utiliza o voriconazol é preciso ter em conta a situação clínica da doente, não sendo aconselhável a toma deste antifúngico em caso de gravidez (Denning e Hope, 2010; Ruhnke *et al.*, 2011).

A realização de mais estudos epidemiológicos em doentes infectadas com leveduras do género *Candida*, tendo em consideração o seu estado de saúde, a sua história clínica e a padronização de metodologias que permitem o conhecimento da sensibilidade dos isolados clínicos aos antifúngicos mais utilizados, pode contribuir para o estabelecimento atempado da terapêutica mais adequada a cada caso para um controlo mais eficaz dessa infecção (Pereira, 2010). Por outro lado a sensibilização por parte do médico da importância de um correcto diagnóstico laboratorial e consciencialização das limitações da terapêutica por parte da doente são também dois factores muito importantes na prevenção do aparecimento de resistências.

#### 4.7.2. – Testes de sensibilidade *in vitro* aos óleos essenciais e extracto vegetal

Com o aumento de resistência aos antifúngicos convencionais actualmente disponíveis para terapêutica antifúngica, a procura de novos antifúngicos mais eficazes e mais inócuos é contínua. Ultimamente são cada vez mais os trabalhos e estudos desenvolvidos em torno das propriedades antifúngicas de óleos essenciais e extractos vegetais de plantas medicinais como possíveis alternativas aos antifúngicos utilizados de momento (Höfling *et al.*, 2010). O método de difusão em disco é um método *standard* que pode ser facilmente utilizado para realizar um rápido *screening* da actividade antifúngica de produtos naturais (Devkotte *et al.*, 2005).

Neste trabalho foi avaliada a actividade antifúngica de três óleos essenciais (*Lavandula latifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis*) e do extracto de grainha de toranja em 6 isolados, três leveduras da espécie *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* de origem portuguesa e três leveduras, duas da espécie *C. albicans* e uma da espécie *C. glabrata* de origem cabo-verdiana, que apresentaram resistência aos antifúngicos fluconazol e voriconazol.

Observando o anexo 3 e fazendo primeiramente uma avaliação geral observou-se que apenas na presença do extracto de grainha de toranja não se formaram halos de inibição, excepto o isolado nº8 que apresentou halos de inibição de 7 mm na presença dos discos de 30 e 40 µL. Quanto aos óleos essenciais observaram-se sempre halos de inibição nas placas de *petri* inoculadas com os isolados em estudo. Verificou-se também que de uma maneira geral com o aumento da quantidade de óleo inoculada no disco, aumentou também o halo de inibição, excepto o isolado nº133, que na presença do óleo essencial *Rosmarinus officinalis* com um disco de 40 µL, o halo observado foi inferior ao de 30 µL e igual ao disco de 20 µL. Também na presença do óleo *Lavandula latifolia* o isolado nº114 se comportou da mesma forma.

Fazendo uma avaliação dos resultados óleo a óleo observou-se que na presença do óleo essencial *Rosmarinus officinalis*, os halos inibição formados variaram entre 7 e os 22 mm.

No caso da *Melaleuca alternifolia* observaram-se halos de inibição entre os 10 e os 40 mm, parecendo ser óleo mais eficaz na inibição do crescimento dos isolados estudados.

Na presença da *Lavandula latifolia*, os halos de inibição observados variaram entre os 8 e os 40 mm.

Dos seis isolados estudados, o isolado nº8 foi aquele em que os três óleos se mostraram menos eficazes na inibição do crescimento fúngico. No isolado nº49, *Melaleuca alternifolia* e *Lavandula latifolia* apresentaram uma acção muito semelhante, mas aparecendo *Melaleuca alternifolia* com uma acção superior no disco de 10 µL. *Rosmarinus officinalis* apresentou uma acção antifúngica inferior em relação aos outros dois óleos. Também isolado nº49 a inibição por *Lavandula latifolia* e *Melaleuca alternifolia* foi muito semelhante nos discos de 30 e 40 µL verificando-se no entanto nos discos de 10 e 20 µL uma inibição superior por parte de *Lavandula latifolia*. *Rosmarinus officinalis* novamente apresentou uma acção antifúngica menor que *Lavandula latifolia* e *Melaleuca alternifolia* para este isolado.

Já com o isolado nº112, *Melaleuca alternifolia* foi a mais eficaz na inibição do crescimento fúngico seguida por *Lavandula latifolia* e por fim *Rosmarinus officinalis*. No isolado nº114, novamente *Lavandula latifolia* e *Melaleuca alternifolia* apresentaram acção fúngica semelhante, observando-se no entanto, que o disco com 10 µL de óleo essencial de *Lavandula latifolia* exerceu uma acção antifúngica inferior. Neste isolado novamente *Rosmarinus officinalis* foi o óleo que menos inibiu o crescimento fúngico. Finalmente, com o isolado nº133, *Melaleuca alternifolia* foi mais eficaz, destacando-se profundamente em relação os outros dois óleos essenciais, sendo que a acção antifúngica de *Lavandula latifolia* e *Rosmarinus officinalis* foi muito semelhante para este isolado.

Quanto à estirpe de *C. albicans* ATCC 90028, a acção antifúngica dos três óleos (*Lavandula latifolia*, *Melaleuca alternifolia* e *Rosmarinus officinalis*) foi muito semelhante aparecendo, no entanto, um halo de inibição de 15 mm no disco de 40 µL tanto na presença de *Melaleuca alternifolia* como de *Rosmarinus officinalis*.

Devkotte *et al.* (2005) avaliaram a actividade antifúngica dos óleos de *Rosmarinus officinallis* e *Melaleuca alternifolia* em quatro isolados de *C. albicans* obtendo halos de inibição de 8,3; 10,0 e 12,3 mm para *Rosmarinus officinalis* e halos de 11,0; 14,6; 17,0 e 24 mm para *Melaleuca alternifolia*.

Anibal *et al.* (2010) também reportaram uma notável actividade antifúngica de *Rosmarinus officinallis* em *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

Por sua vez, num estudo realizado por Rosato *et al.* (2008) também foi detectada actividade antifúngica por parte de *Melaleuca alternifolia* em *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* obtendo-

se halos de inibição entre 5,3 e 17 mm para *C. albicans*, 13,3 mm para *C. glabrata* e 8,3 mm para *C. parapsilosis*. Nestes resultados não foi considerado o diâmetro do disco de 8 mm.

Höfling *et al.* (2010) também obtiveram actividade antifúngica do óleo *Rosmarinus officinallis* em relação a isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, mas no seu trabalho realizaram testes com extractos da própria planta e não com os óleos essenciais da mesma.

Contrariamente, Khan *et al.* (2012) no trabalho que realizaram não detectaram actividade antifúngica quando utilizaram *Rosmarinus officinallis*. Em relação a extractos ou a óleos essenciais de *Lavandula latifolia* não foram encontrados na bibliografia informações à sua possível actividade antifúngica.

Neste trabalho observaram-se halos de inibição significativos com os óleos essenciais estudados, que se traduzem em actividade antifúngica por parte dos mesmos nas seis leveduras do género *Candida* estudadas. No entanto é necessário ter presente que a técnica de difusão em disco apenas fornece dados preliminares, não sendo possível obter concentrações mínimas inibitórias, devido a natureza hidrófoba da maioria dos óleos essenciais onde a viscosidade do próprio óleo dificulta a difusão uniforme deste no meio de cultura (Nascimento *et al.*, 2007). Será necessário, posteriormente, realizar os testes em meio líquido, em microdiluição, à semelhança do que foi feito para os fármacos antifúngicos (ponto 3.6.2).

Outro factor importante a ser considerado na validação do efeito antifúngico do óleo é o conhecimento das particularidades de cada microrganismo, bem como as do óleo a ser analisado. Se estivermos perante isolados fúngicos, deve-se ter em conta o tempo de incubação, uma vez que este, nos casos dos óleos essenciais, requer entre dois a 15 dias, o que pode interferir no diâmetro do halo de inibição de alguns óleos, devido à decomposição ou evaporação dos mesmos durante o período de teste (Nascimento *et al.*, 2007).

#### **4.8. – Conclusões**

A candidíase vaginal é uma das infecções mais comuns do tracto genital feminino, cuja ocorrência é influenciada por diversos factores (Nova, 2006) e afecta milhões de mulheres em cada ano, por todo o mundo, sendo a causa mais comum de vaginite aguda na Europa, Estados Unidos e em certos países tropicais (Paiva *et al.*, 2012).

O diagnóstico da etiologia desta infecção é muito importante e geralmente difícil quando baseado unicamente em critérios clínicos, sendo fundamental a escolha adequada das metodologias de identificação microbiana para um correcto diagnóstico (Pereira, 2010). Em geral, os laboratórios de

microbiologia clínica recorrem a metodologias de identificação convencional devido aos baixos custos que estas apresentam.

Por outro lado, o aumento do número de casos de resistência aos azóis, fármacos mais utilizados no tratamento destas infecções, por parte das leveduras do género *Candida* tem-se tornado uma preocupação global (Pfaller, 2012), sendo a procura de novas alternativas aos antifúngicos convencionais, nomeadamente a pesquisa de plantas com propriedades antifúngicas, uma prática cada vez mais necessária e premente (Scorzoni *et al.*, 2007).

Assim este trabalho propôs-se a testar métodos de detecção e identificação moleculares de diferentes espécies de leveduras de interesse médico do género *Candida* de forma a comprovar se estes seriam suficientemente práticos, mais económicos e rápidos para que pudessem ser aplicados em rotina de laboratórios de microbiologia clínica, nomeadamente laboratórios hospitalares. Para isso foram estudados dois grupos de isolados clínicos de exsudados vaginais provenientes de dois países: Portugal e Cabo-Verde.

Foi também proposto um estudo comparativo entre as estirpes isoladas de cada país quanto a semelhanças ou diferenças através da identificação convencional, molecular e também quanto à sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos mais utilizados no tratamento destas infecções, não esquecendo algumas características das pacientes envolvidas no estudo que facilitasse o entendimento da possível causa da infecção e consequente tratamento.

Foi também proposta a pesquisa de leveduras da espécie *C. africana* entre as leveduras encontradas nos isolados de origem cabo-verdiana.

De modo a tentar fazer um estudo preliminar dos possíveis mecanismos responsáveis pela resistência aos antifúngicos azólicos pelas estirpes de *C. albicans*, nos quais está implicada nomeadamente a acção do gene *ERG11*, pretendeu-se identificar possíveis diferenças nas sequências deste gene em quatro estirpes seleccionadas, duas susceptíveis e duas resistentes, sendo um par de Portugal e outro de Cabo-Verde.

Por fim de modo a encontrar alternativas para a resistência aos antifúngicos convencionais mais utilizados no tratamento de candidíases vulvovaginais propôs-se a realização de um estudo preliminar da sensibilidade *in vitro* de isolados de leveduras do género *Candida* aos óleos essenciais de *Lavandula latifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* e extracto de grão de toranja.

Das 216 amostras recolhidas para este trabalho foram obtidos 100 isolados de Portugal e 42 de Cabo-Verde.

Relativamente à ocorrência das diferentes espécies de *Candida* nos 142 isolados concluiu-se que a espécie *C. albicans* foi a espécie mais frequente tanto com Portugal (85%) com em Cabo-Verde (69%). No entanto, quanto à segunda espécie mais frequente, já se verificaram diferenças entre os dois países. No caso de Portugal foi *C. glabrata* a mais frequente (8%) e em Cabo-Verde foi *C. parapsilosis* (19%). Foram ainda isoladas as espécies *C. tropicalis* e *C. lusitaniae* (esta última somente em Portugal).

Em primeiro lugar observou-se que a idade das pacientes, cujas espécies de *Candida* foram isoladas, variou entre os 13 e 43 anos em Portugal e 15 e 50 anos em Cabo-Verde. Quanto à percentagem de isolados oriundos de grávidas e não grávidas, nos dois países houve uma percentagem mais elevada de proveniência de grávidas (75% para Portugal e 54,8% para Cabo-Verde).

Quanto aos métodos de identificação convencional e molecular verificou-se que o exame directo apresenta um papel importante na identificação de leveduras ajudando na realização do diagnóstico da etiologia da infecção. No entanto, não deve ser o único método utilizado no diagnóstico pois também está sujeito ao aparecimento de falsos positivos, sendo aconselhada a realização em simultâneo, a inoculação da amostra em meio de cultura para identificação da espécie causadora de infecção.

O Teste da Blastese diferenciou praticamente todas as leveduras da espécie *C. albicans sensu lato* e não-*albicans* nos isolados provenientes dos dois países, notando-se no entanto, que a percentagem descrita na literatura de *C. albicans* que não forma tubo germinativo (5%) foi superior tanto em Portugal como em Cabo-Verde. Neste aspecto os métodos moleculares utilizados permitiram a identificação correcta dos isolados.

As metodologias de identificação convencionais utilizadas tanto da MAC como no HAN mostraram uma sensibilidade de identificação inferior às metodologias moleculares utilizadas neste trabalho, não permitindo por vezes a correcta identificação das espécies. Este facto é muito importante na medida em que a terapêutica antifúngica deve ser escolhida tendo em conta a espécie causadora da infecção de modo a tornar o tratamento eficaz e evitar o aparecimento de resistências aos antifúngicos utilizados.

Os dois métodos moleculares utilizados neste trabalho mostraram ser simples, rápidos e eficazes, possíveis de ser aplicados em rotina nos laboratórios de microbiologia, nomeadamente laboratórios hospitalares. No entanto, a identificação apenas de espécies do género *Candida* para as quais existam *primers* específicos e o investimento inicial necessário para a aquisição dos equipamentos requeridos para a execução destes métodos apresentam-se como desvantagens inerentes.

A pesquisa de *C. africana* e subsequente identificação de 4 isolados entre os 29 convencionalmente e molecularmente identificados como sendo *C. albicans* provenientes de Cabo-Verde, revelou que as metodologias actuais de identificação não distinguem *C. albicans* de *C. africana*, sendo fulcral a realização de mais estudos de modo a conhecer mais sobre as características epidemiológicas de *C. africana*, verificar se de facto está apenas associada a infecções fúngicas vaginais e se se pode considerar uma espécie individualizada com, por exemplo, maior resistência aos fármacos, ou apenas uma variante de *C. albicans*. No entanto a não identificação de alguns isolados e o aparecimento de duas bandas ao invés de uma única foi um resultado incompatível com o que está descrito na literatura e premente em futuros estudos.

A sequenciação e a análise por comparação visual dos fragmentos correspondentes às três fracções do gene *ERG11* permitiu a identificação de algumas diferenças entre as estirpes seleccionadas de *C. albicans* sensíveis e resistentes. No entanto, consideramos que as diferenças detectadas não são suficientes para transmitir informação para que se possa afirmar inequivocamente que se tratam de mutações no gene *ERG11* e que as mesmas são responsáveis pela resistência demonstrada pelas duas estirpes resistentes. No entanto, este estudo preliminar deixa em aberto muitas possibilidades de estudar a resistência aos fármacos a nível genético/molecular.

No estudo da sensibilidade *in vitro* pelo método de Kirby-Bauer, tantos os isolados clínicos provenientes de Portugal como de Cabo-Verde evidenciaram, de uma forma geral, uma elevada sensibilidade tanto ao fluconazol como ao voriconazol, apesar de este último se mostrar um pouco mais eficiente nomeadamente no caso dos isolados de origem portuguesa. O método de difusão em disco (CLSI documento M44-A) relevou ser uma técnica económica e de fácil execução em qualquer laboratório de microbiologia clínica (Sheehan *et al.*, 2006). Permite um *screening* rápido da sensibilidade aos antifúngicos convencionais, possibilitando também a detecção de leveduras do género *Candida* com sensibilidade reduzida ao fluconazol (fármaco mais utilizando em Portugal nos tratamentos de candidíase vulvovaginal). Todavia, para a obtenção de informações mais rigorosas quanto à concentração mínima inibitória necessária de cada antifúngico para as diferentes espécies do género *Candida*, é fundamental a aplicação de metodologias mais rigorosas e sensíveis, nomeadamente a técnica da microdiluição. Esta consideração é importantíssima quando se está perante isolados que se apresentam resistentes aos antifúngicos testados pelo método de Kirby-Bauer, embora saibamos que requer maior laboriosidade e custos laboratoriais.

Por último no estudo da sensibilidade *in vitro* aos três óleos essenciais (*Lavandula latifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis*), *Lavandula latifolia* e *Melaleuca alternifolia* revelaram-se como sendo os óleos com maior acção antifúngica, vindo *Rosmarinus officinalis* em segundo lugar. Já no caso do extracto de grainha de toranja, a acção antifúngica foi praticamente nula. Contudo este estudo permitiu apenas a realização um *screening* inicial sobre a acção antifúngica dos



óleos essenciais e extracto seleccionados não sendo possível comparar com a sua acção com a dos antifúngicos convencionais. Para isso seria necessária a aplicação de uma metodologia mais rigorosa, como por exemplo o método da microdiluição.

Este trabalho contribuiu ainda para o conhecimento da realidade de Cabo-Verde quanto à prevalência de espécies de *Candida* responsáveis por infecções fúngicas vaginais e da sensibilidade que apresentam ao fluconazol (fármaco apenas utilizado em casos de candidíase recorrente) e ao voriconazol. Estes dados são inovadores e importantes para o conhecimento e posterior tratamento de pacientes nas várias instituições hospitalares deste país.

#### 4.9. – Perspectivas futuras

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez."  
George Bernard Shaw, escritor irlandês

Em Portugal foram poucos os estudos desenvolvidos até ao momento sobre infecções fúngicas vaginais e em Cabo-Verde não existe qualquer estudo realizado até à data. Este trabalho levantou algumas questões pertinentes, alertando para a importância de realizar futuras investigações de modo a que possam vir a ser esclarecidas.

Seria importante em primeiro lugar estudar mais aprofundadamente a espécie *C. africana*. Por outro lado, perceber o motivo pelo qual a metodologia aplicada na identificação desta espécie levou ao aparecimento de duas bandas nuns casos ou à ausência destas em outros, situações que não estão referidas na literatura. Por outro lado, seria indicado realizar outros estudos mais abrangentes, utilizando outras metodologias, de modo a confirmar se realmente existe uma grande prevalência de *C. africana* entre a população cabo-verdiana.

No primeiro ponto poder-se-ia recorrer à sequenciação do gene *HWP1* e compará-lo com estirpes de *C. albicans*, de *C. africana*, bem como de *C. dubliniensis*, de modo a identificar semelhanças ou diferenças entre as diferentes espécies e assim perceber se, por exemplo, ocorreram mutações no gene *HWP1* alterando o local de hibridação dos *primers* utilizados, no DNA das estirpes/espécies ou, se no caso das duas bandas na realidade não estariam duas espécies distintas na mesma amostra/cultura.

No segundo ponto, de modo a realizar o sugerido seria importante ser estudada a presença e prevalência de *C. africana*, não só em outras zonas de Cabo-Verde, tanto da ilha de Santiago como também de outras ilhas do arquipélago. Desta forma seria possível a determinação da prevalência de *C. africana*, pelo menos, na população cabo-verdiana.



Outro ponto interessante passível de estudo futuro seria a pesquisa de *C. africana* na população portuguesa. Devido ao constante fluxo migratório das populações e à grande comunidade africana residente em Portugal, nada garante que *C. africana* não coabite já na flora vaginal de mulheres residentes em Portugal, portuguesas e não portuguesas.

Já em relação à questão levantada pela análise dos fragmentos do gene *ERG11* de estirpes *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol e ao voriconazol, de futuro seria interessante identificar a presença de possíveis mutações ao nível do gene *ERG11* e tentar perceber se essas mutações seriam as responsáveis pela resistência observada por parte das estirpes resistentes aos azóis estudados, averiguando se ocorrem alterações ao nível dos aminoácidos na proteína Erg11p.

Para a complementação do estudo da sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos convencionais seria interessante determinar a concentração mínima inibitória requerida para cada isolado e confirmar se os isolados que se mostraram resistentes ao fluconazol e ao voriconazol pelo método de Kirby-Bauer também seriam resistentes quando avaliados pelo método da microdiluição padronizado pelo CLSI, um método rigoroso embora mais demorado, trabalhoso e dispendioso, mas também mais preciso e internacionalmente reconhecido.

De modo a possibilitar uma comparação entre a acção antifúngica dos fármacos antifúngicos convencionais e dos óleos essenciais seria indicada igualmente a aplicação também do método da microdiluição. Esta possivelmente iria permitir a determinação das concentrações mínimas inibitórias e também de resultados mais fidedignos e passíveis de comparação entre isolados e entre antifúngicos e produtos naturais.

## 5 - Bibliografia

- ◆ Adriole, V.T. 1999. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:151-162.
- ◆ Alonso-Vargas, R., Elorduy, L., Eraso, E., Cano, J.F., Guarro, J., Pontón, J. e Quindós, G. 2008. Isolation of *Candida africana*, probable atypical strain of *Candida albicans*, from a patient with vaginitis. *Medical Mycology* 46:167-170.
- ◆ Altiec. 2012. Spike lavender, Life & Essential, Version 20 July 2012. [http://www.addme.net.au/products\\_info/english/spike\\_lavender.htm](http://www.addme.net.au/products_info/english/spike_lavender.htm) in Jully, Life & Essential, <http://www.addme.net.au/>.
- ◆ Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A. e Guiraud, J.P. 2012. OTA-Producing fungi in foodstuffs: A review *Food Control* 26:259-268.
- ◆ Amore, A. e Faraco, V. 2012. Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:3286-3301.
- ◆ Anibal, P.C., Sardi, J.C.O., Peixoto, I.T.A., Moraes, J.J.C. e Höfling, J.F. 2010. Conventional and Alternative Antifungal Therapies to Oral Candidiasis. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:824-831.
- ◆ Arancia, S., Sandini S., Cassone, A., De Bernardis, F., 2009. Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in PCR methods for the identification of five medically important *Candida* species. *Molecular and Cellular Probes* 23:218-226.
- ◆ Bagg, J., Jackson, M.S., Sweeney, M.P., Ramage, G. e Davies, A.N. 2005. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeast isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *Oral Oncology* 42:487-492.
- ◆ Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. e Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446-475.
- ◆ Barbedo, L.S. e Sgarbi, D.B.G. 2010. Candidíase. DTS: *Jornal Brasileiro de Doenças sexualmente transmissíveis* 22:22-38.
- ◆ Benedetti, V.P., Fornari, G. e Schervinski, N.R. 2011. Avaliação da Susceptibilidade a Antifúngicos de Diferentes Espécies de Leveduras *Candida* Isoladas de Mucosa Bucal e Pele *RBAC* 43:93-95.
- ◆ Bingre, P. 2005. O Rosmaninho em Portugal. Versão 22 Julho 2012. [http://www.uc.pt/herbario\\_digital/Enc\\_plantas/rosmaninho](http://www.uc.pt/herbario_digital/Enc_plantas/rosmaninho) em *Herbário de Universidade de Coimbra*, *Enciclopédia das plantas*, [http://www.uc.pt/herbario\\_digital/Enc\\_plantas/](http://www.uc.pt/herbario_digital/Enc_plantas/).
- ◆ Campbell, C.K., Johnson, E.M., Philpot, C.M. e Warnock, D.W. 1996. Identification of pathogenic Fungi. *Public Health Laboratory Service*, Inglaterra.
- ◆ Cardoso, B.C. 2004. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Tese de mestrado. Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga.
- ◆ Carvalho, A., Costa-de-Oliveira, S., Martins, M.L., Vaz-Pina, C., Rodrigues A.G., Ludovico, P. e Rodrigues, F. 2007. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Medical Mycology* 49:619-627.
- ◆ Carvalho, E.E. 2008. Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humana – Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares. Tese de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- ◆ Chong, P.P., Hadi, S.R.A., Lee, Y.L., Phan, C.L., Tan, B.C., Ng, K.P. e Seow, H.F. 2007. Genotyping and drug resistance profile of *Candida spp.* in recurrent and one-off vaginitis, and high association of *non-albicans* species with non-pregnant status. *Infection, Genetics and Evolution* 7 449–456.
- ◆ Costa-de-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonça, D. e Rodrigues, A.G. 2008. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:365-374.
- ◆ Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington J.R. e Wyllie, S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol* 88:170-175.
- ◆ Cvetni, Z. e Vladimir-Kneževi S. 2004. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm* 54:243-250.
- ◆ Dan, M., Leshem, Y. e Yeshaya, A. 2010. Performance of a rapid yeast test in detecting *Candida spp.* in the vagina. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 67:52–55.

- ◆ Dembinski, A., Warzecha, Z., Konturek, S.J., Ceranowicz, P., Dembinski, M., Pawlik, W.W., Kusnierz-Cabala, B. e Naskalski, J.W. 2004. Extract of grapefruit-seed reduces acute pancreatitis induced by ischemia/reperfusion in rats; Possible implication of tissue antioxidants. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55:811-821.
- ◆ Denning, D.W. e Hope, W.W. 2010. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in Microbiology* 18.
- ◆ Devkotte, A.N., Zore, G.B. e Karuppayil, S.M. 2005. Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research* 5:867-873.
- ◆ Dial, S.M. 2007. Fungal Diagnostics: Current Techniques and Future Trends. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 37:373-392.
- ◆ Diegn, Y., Sow, D., Ndiaye, M., Guichet, E., Faye, B., Tine, R., Lo, A., Sylla, K., Ndiaye, M., Abiola, A., Dieng, T., Ndiaye, J.L., Le Pape, P. e Gaye, O. 2012. Identification de trois sources de *Candida africana* au Sénégal. *Journal de Mycologie Médicale* 22:335-340.
- ◆ Einsele H., Hebart H., Roller G., Löffler J., Rothenhöfer I. e Müller C.A. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clin. Microbiol* 35:1353-60.
- ◆ Elias, N.A., Cuestas, M.L., Sandoval, M., Poblete, G., Lopez-Daneri, G., Jewtuhowicz, V., Iovannitti C. e Mujica, M. T. 2012. Rapid Identification of *Histoplasma capsulatum* Directly from Cultures by Multiplex PCR. *Mycopathologi*.
- ◆ Ellis D. 2012. Mycology online, The University of Adelaide, Version 19 de Agosto de 2012. [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Yeasts/Candida/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Yeasts/Candida/) in Mycology online: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>.
- ◆ Faria, N.C.G. 2007. Use of Natural Products to Enhance Activity of Antifungal Drugs through Chemosensitization of the Pathogenic Yeasts *Candida spp.* and *Cryptococcus neoformans*. Tese de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa.
- ◆ Ferreira, A.S.A. 2008. Infecções fúngicas – Diagnóstico e epidemiologia. Tese de Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- ◆ Ferronato, R., Marchesan, E.D., Pezenti, E., Bednarski, F. e Onofre, S.B. 2007. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17:224-230.
- ◆ Fidel, P.L. 2006. History and Update on Host Defense Against Vaginal Candidiasis. *Am. J. Reprod. Immunol* 57:2–12.
- ◆ Fleet, G.H. 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 18:170-175.
- ◆ Forbes, B.A., Sahm, D. F., Weisefeld, A. S. 2002. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Miosby.
- ◆ Freitas, W.V.C. e Sousa, J.C F. 2000. *Microbiologia*. Lidel, Portugal.
- ◆ Gomes, F. 2012. Determinação e comparação de genótipos de *Candida albicans* pelo método de PCR, com base nos polimorfismos da região 25S rDNA e das sequências ALT/RPS. Tese de mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- ◆ Gumral, R., Sancak, B., Guzel, A.B., Saray, M.A. e Ilkit M. 2011. Lack of *Candida africana* and *Candida dubliniensis* in Vaginal *Candida albicans* Isolates in Turkey Using *HWP1* Gene Polymorphisms. *Mycopathologia* 172:73-76.
- ◆ Gurulingappa, P., Sword, G.A., Murdoch, G. e McGee, P.A. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when *in planta*. *Biological control* 55:34-41.
- ◆ Ha, Y., Lee, B., Lee, B., Bae, H., Je, K.M., Kim, S.R., Choi, J. e Choi, I.S. 2009. Anti-microbial Activity of Grapefruit Seed Extract and Processed Sulfur Solution against Human Skin Pathogens. *Journal of Life Science* 19:94-100.
- ◆ Hassan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N. e Fries, B.C. 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection* 11:753-761.
- ◆ Hasunuma, T. e Kondo, A. 2012. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology Advance* 30:1207-1218.
- ◆ Höfling, J.F., Anibal, P.C., Obando-Perena, G.A., Peixoto, I.A.T., Furletti, V.F., Foglio, M.A. e Gonçalves, R.B. 2010. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Braz. J. Biol.* 70:1065-1068.

- ◆ Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R., Knogge, W. e Deising, H.B. 2011. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168:51-62.
- ◆ Inácio, J., Flores, O. e Spencer-Martins, I. 2008. Efficient Identification of Clinically Relevant *Candida* Yeast Species by Use of an Assay Combining Panfungal Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification with Hybridization to Species-Specific Oligonucleotide Probes. *Journal of Clinical Microbiology* 46:713-720.
- ◆ Justino, C.I., Duarte, K., Loureiro, F., Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S. M., Gonçalves, F., Rocha-Santos, T.A.P. e Freitas, A.C. 2009. Toxicity and organic content characterization of olive oil mill wastewater undergoing a sequential treatment with fungi and photo-Fenton oxidation. *Journal of Hazardous Materials* 172:1560-1572.
- ◆ Kalkanci, A., Güzel, A.B., Khalil, I.I.J., Aydin, M., Ilkit, M. e Kuştimur, S. 2012. Yeast vaginitis during pregnancy: susceptibility testing of 13 antifungal drugs and boric acid and the detection of four virulence factors. *Medical Mycolgy* 50:585-593.
- ◆ Kappe, R. e Muller, J. 1998. Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. *J. Clin. Microbiol.* 29:1665-1669.
- ◆ Katz. 2008. Infect. Dis. Clin. North. Am. 22:637-652: <http://www.lowmg.com/info/gynecology/std/vulvovaginitis.pdf>.
- ◆ Khan, M.S.A., Malik, A. e Ahmad, I. 2012. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fuconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology* 50:33-42.
- ◆ Kwon-Chung, K.J. e Bennett, J.E. 1992. *Medical Micology*. Lea & Febiger
- ◆ Lange, L. 2010. The importance of fungi for a more sustainable future on our planet. *Fungal Biology Reviews* 24:90-92.
- ◆ Larone, D.H. 2002. "Medically important fungi, a guide to identification" 4th ed. Washington D.C.
- ◆ Linares, M.J., Charriel, G., Solis, F., Rodriguez, F., Ibarra, A. e Casal, M. 2005. Susceptibility of Filamentous Fungi to Voriconazol Tested by Two Microdilution Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 250-253.
- ◆ Lincy, S.V., Latha, R., Chandrashekar, A. e Manonmani, H.K. 2008, Detection of toxigenic fungi and quantification of type A trichothecene levels in some food and feed materials from India. *Food Control* 19:962-966.
- ◆ Linguori, G., Di Onofrio, V., Gallé, F., Lucariello, A., Albano, L., Catania, M.R. e Guida, M. 2010. *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. *J Prev Med Hyg* 51:121-124.
- ◆ Llovo, J. e Pontón, J. 2007. Diagnóstico microscópico de las micosis. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- ◆ Manoharlal, R. 2008. Differential regulation of multidrug resistance gene(s) in the clinical isolates of pathogenic yeast *Candida albicans*. Phd Thesis. School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University.
- ◆ Marie, C. e White, T.C. 2009. Genetic basis of antifungal drug resistance. *Current Fungal Infeccion Reports* 3:163-169.
- ◆ Medo, J. e Cagán, L. 2011. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biological control* 59:200-208.
- ◆ Meylin, N.V. e Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43:145-155.
- ◆ Minami, P. S. 2003. *Micologia-Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses*. Editora Manole Ltda, Brasil.
- ◆ Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M. e Yamaguchi, H. 2006. A one enzyme PCR-RFLP assay for Identification of six Medically Important *Candida* Species. *Jpn. J. Med. Mycol.* 47: 225-229.
- ◆ Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M. e Yamaguchi, H. 2005. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Using a Single-Enzyme PCR-RFLP Method. *Journal of Clin. Microbiol.* 58: 235-237.
- ◆ Morales, H., Sanchis, V., Usall, J., Ramos, A.J. e Marin, S. 2008. Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *International Journal of Food Microbiology* 122:61-67.

- ◆ Morio, F., Loge, C., Besse, B., Hennequin, C. e Le Pape, P. 2010. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature.
- ◆ Morschhäuser, J. 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 47:94–106.
- ◆ Namkinga, L.A., Matee, M.I.N., Kivaisi, K., Kullaya, A. e Mneney, E.E. 2005. Identification of *Candida* strains isolated from Tanzanian pregnant women with vaginal candidiasis. *East African Medical Journal* 82:226-234.
- ◆ Nascimento, P.F.C., Nascimento, A.C., Rodrigues, C.S., Santos, P.O. Júnior, A.M.B. e Trindade, R.C. 2007. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17: 108-113.
- ◆ Nnadi, N.E., Ayanbimpe, G.M., Scordino, F., Okolo, M.O., Enweani, I.B., Criseo, G. e Romeo, O. 2012. Isolation and molecular characterization of *Candida Africana* from Jos, Nigeria. *Medical Mycology* 50:765-767.
- ◆ Nova, T.C.A.P. 2006. Diagnóstico de Candidoses Vaginais e Avaliação da Sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos. Tese de mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa.
- ◆ Odds, F.C. e Jacobsen, M.D. 2008. Multilocus Sequence Typing of Pathogenic *Candida* Species. *Eukaryotic Cell* 7:1075-1084.
- ◆ Paiva, L.C.F., Vidigal, P.G., Donatti, L., Svidzinski, T.I.E., Consplaro, M.E.L. 2012. Assessment of *in vitro* biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristic. *Micron* 43:497-502.
- ◆ Panizo, M.M., Reviákina, V., Dolande, M. e Selgrad, S. 2009. *Candida* spp. *in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Medical Mycology* 47:137-143.
- ◆ Pereira, A.P.V. 2010. Identificação Molecular de Candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. Métodos Convencionais vs. Métodos Moleculares. Tese de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- ◆ Pfaller, M.A. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. *The American Journal of medicine* 125:S3-S13.
- ◆ Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Giggs, D.L., Newell, V.A., Ellis, D., Tullio, V., Rodloff, A, Fu, W., Ling, T.A. e the Global Antifungal Surveillance Group. 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology* 48:1366-1377.
- ◆ Pietrella, D., Angiolella, L., Vavalaz, E., Rachini, A., Mondello, F., Ragno, R., Bistoni, F. e Vecchiarulli, A. 2011. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2011
- ◆ Pincus, D.H., Oregas, S. e Chatellier, S. 2007. Yeast identification - past, present, and future methods. *Medical Mycology* 45:97-121.
- ◆ Pirodda, M.V. e Garland, S. 2006. Genital *Candida* Species Detected in Samples from Women in Melbourne, Australia, before and after Treatment with Antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology* 44:3213-3217.
- ◆ Pisseri, F., Bertoli, A., Nardoni, S., Pinto, L., Pistelli, L., Guidi, G. e Mancianti. 2009. Antifungal activity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against *Trichophyton equinum*: An *in vitro* assay. *Phytomedicine* 16:1056-1058.
- ◆ Prata, A.C.B., 2007. Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas - Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares. Tese de mestrado. Universidade de Aveiro.
- ◆ Rad, M., Zafarghandi, S., Abbasabadi, B. e Tavallaee, M. 2011. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 155:199-203.
- ◆ Rad, M.M., Zafarghandi, A.S., Zabihi, M.A., Tavallaee, M. e Mirdamidi, Y. 2012. Identification of *Candida* Species Associated with Vulvovaginal Candidiasis by Multiplex PCR. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*.
- ◆ Reiss E. e Odds O. 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Medical Mycology* 36: 249-57.

- ◆ Ribeiro, M.A. e Paula, C.R. 2007. Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated *in vitro*: is there any clinical implication? Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 57:71-75
- ◆ Romeo O., Racco, C. e Criseo, G. 2006. Amplification of Hyphal Wall Protein 1 Gene to Distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. Journal of Clinical Microbiology 44:2590-2592.
- ◆ Romeo, O. e Criseo, G. 2008. First molecular method for discriminating between *Candida Africana*, *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by *hwp1* gene. Diagnostic Microbiology and Infections Disease 62:230-233.
- ◆ Romeo, O. e Criseo, G. 2009. Molecular Epidemiology of *Candida albicans* and Its Closely Related Yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. Journal of Clinical Microbiology 47:212-214.
- ◆ Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L. e Mallamaci, R. 2008. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. Phytomedicine 15: 635-638.
- ◆ Ruhnke, M., Rickerts, V., Cornely, O.A., Buchheidt, D., Glöckner, A., Heinz, W., Höhl, R., Horré, R., Karthaus, M., Presterl, E., Rath, P., Ritter, J., Glasmacher, A., Lass-Flöri, C. e Groll, A.G. 2011. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. Mycoses 54:279-310.
- ◆ Sabino, R., Sampaio, P., Carneiro, C., Rosado, L. e Pais, C. 2011. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. BCM Microbiology 11:180
- ◆ Samaranayake, D.P. e Hanes, S.D. 2011. Milestones in *Candida albicans* gene manipulation. Fungal Genetics and Biology 48:858-865.
- ◆ San-Blas, G. e Calderone, R.A. 2004. Pathogenic Fungi - Structural Biology and Taxonomy. Caister Academic Press, Inglaterra.
- ◆ Sanglard, D., Coste, A. e Ferrari, S. 2009. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research. 9:1029-1050.
- ◆ Sati, S.C. e Joshi, S. 2011. Aspects of Antifungal Pontencial od Ethnobotanically Known Medical Plants. Research Journal of Medical Plant 5(4):377-391.
- ◆ Scorzoni, L., Bernaducci, T., Almeida, A.M.F., Silva, D.H.S., Bolzani, V. S. e Gianinni, M. J. S. M. 2007. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida sp.* and *Cryptococcus sp.* Brazilian Journal of Microbiology 38:391-397.
- ◆ Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological control 50: 205-221.
- ◆ Sheehan, D.J., Brown, S.D., Pfaller, M.A., Warnock, D.W., Rex, J.H., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., Moore, L.S., Odds, F.C., Rinaldi, M.G. e Walsh, T.J. 2006. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. M44-A OU Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved standard. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M44-A; 2006
- ◆ Simons, R.D.G.PH., 1954, Medical Mycology, Elsevier Publishing Company, New York
- ◆ Sobel, J.D. 2007. Vulvovaginal candidosis. The Lancet. 369: 1961-1971.
- ◆ Sobel, J.D. 2010. Genital Candidiasis. Vaginal Infections.
- ◆ Sobel, J.D., Faro, S., Rex, F., Foxman, B., Ledger, W.J., Nyirjesy, P., Reed, B. e Summers, P. 1998. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 178:203-211.
- ◆ The Harvard Medical School. 2006. Grapefruit and medication: A cautionary note. Version 20 de Julho 2012. <http://www.health.harvard.edu/fhg/updates/update0206d.shtml> in Harvard Health Publications, [www.health.harvard.edu](http://www.health.harvard.edu).
- ◆ Tietz, H.J., Hopp M., Schmalreck A., Sterry W. e Czaika V. 2001. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? Mycoses 44:437-445.
- ◆ Tobin, J.D., Haydock, P.P.J., Hare, M.C., Woods, S.R. e Crump, D.H. 2008. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallid* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. Biological Control 46:194-201.
- ◆ Treagan, L. 2008. *Candida* and its role in opportunistic mycosis. California Association for Medical Laboratory Tecnology, Estados Unidos da América.



- ◆ Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Kike, M., Maniania, N.K., Monzón, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., Rangel, D.EN. e Roy, H.E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2:149-159.
- ◆ Wei, Y., Feng, J. e Luo, Z. 2010. Isolation and genotyping of vaginal non-*albicans* *Candida* spp. in women from two different ethnic groups in Lanzhou, China. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 110:227-230.
- ◆ Willem, J.P. 2005. *O Guia do Óleos Essenciais para Vencer Os Seus Problemas de Saúde*. Bodywell, Lisboa.
- ◆ Willey, J. M., Sherwood, L. M. e Woolverton, C. J. 2008. Prescott, Harley and Klein's Microbiology. McGraw-Hill Internacional Edition, New York.
- ◆ Xu, Y., Chen, L. e Li, C. 2008. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61:798-804.
- ◆ Yang, Q., Wang, J., Wang, H., Chen, X., Ren, S., Li, X., X, Y., Zhang, H. e Li, X. 2012. Evolution of the microbial community in a full-scale printing and dyeing wastewater treatment system. *Bioresource Technology* 117:155-163.
- ◆ Yin, X., Gyles, C.L. e Gong, J. 2012. Grapefruit juice and its constituents augment the effect of low pH on inhibition of survival and adherence to intestinal epithelial cells of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium PT193. *International Journal of Food Microbiology* 158:232-238.
- ◆ Zafar, S., Aqil, F. e Ahman, I. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology* 98:2557-2561.
- ◆ Zalar, P., Novak, M., de Hoog, G.S. e Gunde-Cimerman, N. 2011. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology* 115:997-1007.
- ◆ Zomorodian, K., Rahimi, M.J., Pakshir, K., Motamedi, M., Ghiasi, M.R. e Rezashah, H. Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of *Candida* species. *Journal of Global Infections Diseases* [serial online] 2011 [cited 2013 Mar 10]; 3:357-60. Available from: <http://www.jgid.org/text.asp?2011/3/4/357/91059>.

Anexo 1 – Resultados da identificação convencional e molecular dos isolados clínicos provenientes de Portugal e Cabo-Verde.

IC	Nº lab	OI	Exame directo	Cultura	TB	ID32C®	Resultado do hospital de origem	Resultado do PCR multiplex	Resultado do PCR-RFLP
1	558/11	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
2	559/11	PT	CL; FS	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	<i>C. albicans</i>
3	560/11	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	<i>C. albicans</i>
4	561/11	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
5	562/11	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
6	563/11	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
7	564/11	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
8	565/11	PT	CL	+++	-	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Sem bandas	<i>C. parapsilosis</i>
9	566/11	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
10	567/11	PT	CL; FS	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
11	568/11	PT	CL; FS	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
12	569/11	PT	CL; FS	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	<i>C. albicans</i>
13	570/11	PT	CL; F	+++	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	Sem bandas
14	571/11	PT	CL; F	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
15	572/11	PT	CL; F; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
16	573/11	PT	CL; F	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	<i>C. albicans</i>
17	574/11	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
18	575/11	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	<i>C. albicans</i>
19	576/11	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	<i>C. albicans</i>
20	1/12	PT	CL; PF	+++	-	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	Sem bandas	<i>C. parapsilosis</i>
21	32/12	PT	CL	+++	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
22	39/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	<i>C. albicans</i>
23	40/12	PT	CL; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
24	41/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
25	42/12	PT	CL	+++	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
26	43/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
27	46/12	PT	CL; FS; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
28	47/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d



(Continuação do anexo 1)

IC	Nº lab	OI	Exame directo	Cultura	TB	ID32C®	Resultado do hospital de origem	Resultado do PCR multiplex	Resultado do PCR-RFLP
29	48/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
30	49/12	PT	CL	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
31	51/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
32	52/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
33	53/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
34	54/12	PT	CL; FS; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
35	55/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
36	56/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
37	57/12	PT	CL; PF	+++	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
38	58/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
39	59/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
40	60/12	PT	CL; F; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
41	61/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
42	62/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
43	63/12	PT	CL; PF	+++	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	Sem bandas
44	64/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
45	65/12	PT	CL	+++	+	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	n/d
46	66/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
47	67/12	PT	CL	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
48	68/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
49	69/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
50	77/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
51	78/12	PT	CL	+++	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
52	86/12	PT	CL; PF	+++	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	Sem bandas	Sem bandas
53	87/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
54	88/12	PT	CL	+++	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	n/d
55	89/12	PT	CL; PF; FS	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
56	90/12	PT	CL	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
57	91/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
58	92/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
59	93/12	PT	CL; FS; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
60	94/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d

(Continuação anexo 1)

IC	Nº lab	OI	Exame directo	Cultura	TB	ID32C®	Resultado do hospital de origem	Resultado do PCR multiplex	Resultado do PCR-RFLP
61	95/12	PT	CL	+++	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
62	96/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
63	97/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
64	98/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
65	135/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
66	100/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
67	101/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
68	102/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
69	103/12	PT	CL	+++	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
70	104/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
71	105/12	PT	CL	+++	-	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. lusitanae</i>	n/d
72	106/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
73	107/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
74	108/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
75	109/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
76	110/12	PT	CL; FS; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
77	111/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
78	112/12	PT	CL; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
79	113/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
80	114/12	PT	CL	+++	-	<i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> + <i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
81	115/12	PT	CL; FS; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
82	116/12	PT	CL; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
83	117/12	PT	CL; FS; PF	+++	-	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	Sem bandas
84	118/12	PT	CL; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
85	119/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
86	120/12	PT	CL; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
87	121/12	PT	CL; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
88	122/12	PT	CL; FS; PF	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d

(Continuação do anexo 1)

IC	Nº lab	OI	Exame directo	Cultura	TB	ID32C®	Resultado do hospital de origem	Resultado do PCR multiplex	Resultado do PCR-RFLP
89	123/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
90	124/12	PT	CL; FS; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
91	125/12	PT	CL	+++	-	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
92	126/12	PT	CL	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
93	127/12	PT	CL	+++	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
94	128/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
95	129/12	PT	CL; PF	+++	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> ; <i>C. glabrata</i>	Sem bandas	Sem bandas
96	130/12	PT	CL; FS	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
97	131/12	PT	CL; PF	+++	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	Sem bandas
98	132/12	PT	CL	+++	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sem bandas	Sem bandas
99	133/12	PT	CL; PF	+++	+	n/d	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
100	134/12	PT	CL	+++	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	Sem bandas	Sem bandas
101	184/12	CV	CL; PF	+++	-	n/d	n/d	<i>C. albicans</i>	n/d
102	185/12	CV	CL; FS; PF	+++	-	n/d	n/d	<i>C. albicans</i>	n/d
103	186/12	CV	CL	+++	-	<i>C. parapsilosis</i>	n/d	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
104	187/12	CV	Negativo	+++	-	<i>C. lipolytica</i>	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
105	188/12	CV	CL	++	+	n/d	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
106	189/12	CV	Negativo	+	-	<i>C. glabrata</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
107	190/12	CV	CL	+++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
108	191/12	CV	CL	+++	+	n/d	Negativo	<i>C. albicans</i>	n/d
109	192/12	CV	Negativo	++	-	<i>C. parapsilosis</i>	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
110	193/12	CV	CL	+++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
111	194/12	CV	CL	+++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
112	195/12	CV	CL	++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
113	196/12	CV	Negativo	++	-	n/d	Negativo	<i>C. albicans</i>	n/d
114	197/12	CV	CL	+++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d



(Continuação do anexo 1)

IC	Nº lab	OI	Exame directo	Cultura	TB	ID32C®	Resultado do hospital de origem	Resultado do PCR multiplex	Resultado do PCR-RFLP
115	198/12	CV	CL; PF	+++	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>C. glabrata</i>	n/d
116	199/12	CV	Negativo	++	-	<i>Debaryomyces etchellsii/carsonii</i>	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
117	200/12	CV	Negativo	++	+	n/d	Negativo	<i>C. albicans</i>	n/d
118	202/12	CV	CL	+++	-	n/d	Negativo	<i>C. albicans</i>	n/d
119	203/12	CV	CL	++	-	<i>C. tropicalis</i>	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
120	204/12	CV	CL	+++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
121	205/12	CV	CL	+	-	<i>C. parapsilosis</i>	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
122	206/12	CV	CL; PF	+++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
123	207/12	CV	CL; PF	+++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
124	208/12	CV	CL	+++	-	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
125	209/12	CV	CL	+++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
126	210/12	CV	CL; PF	+++	+	n/d	Negativo	<i>C. albicans</i>	n/d
127	211/12	CV	CL; PF	+++	-	<i>C. tropicalis</i>	Levedura	Sem banda	Sem banda
128	212/12	CV	CL	++	+	n/d	Levedura	<i>C. albicans</i>	n/d
129	214/12	CV	CL	+++	+	n/d	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
130	215/12	CV	CL	++	-	n/d	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
131	216/12	CV	CL	++	+	n/d	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	n/d
132	217/12	CV	Negativo	++	+	n/d	SD	<i>C. albicans</i>	n/d
133	218/12	CV	CL	+++	-	<i>C. glabrata</i>	SD	<i>C. glabrata</i>	n/d
134	219/12	CV	CL	+++	+	n/d	SD	<i>C. albicans</i>	n/d
135	220/12	CV	CL; PF	+++	+	n/d	SD	<i>C. albicans</i>	n/d
136	221/12	CV	CL	+++	+	n/d	SD	<i>C. albicans</i>	n/d
137	222/12	CV	CL; FS; PF	+++	+	n/d	SD	<i>C. albicans</i>	n/d
138	223/12	CV	CL	+++	-	<i>C. glabrata/S. cerevisiae</i>	SD	<i>C. glabrata</i>	n/d
139	224/12	CV	CL	+++	+	n/d	SD	<i>C. albicans</i>	n/d
140	225/12	CV	CL	+++	-	<i>C. parapsilosis</i>	SD	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
141	226/12	CV	CL	++	-	<i>C. parapsilosis</i>	SD	<i>C. parapsilosis</i>	n/d
142	227/12	CV	CL	+++	+	n/d	SD	<i>C. albicans</i>	n/d

Legenda: IC-Isolado clínico; OI-Origem do isolado; N° lab-Número do laboratório; TB-Teste da Blastese; SD-Sem diagnóstico

Anexo 2 – Resultados do estudo da sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos fluconazol e voriconazol pelo método de Kirby-Bauer dos isolados clínicos provenientes de Portugal e Cabo-Verde.

IC	Nº lab	OI	Fluconazol			Voriconazol		
			Diâmetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade	Diâmetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade
1	558/11	PT	33	0,68	Susceptível	40	<0,01	Susceptível
2	559/11	PT	6	>165	<b>Resistente</b>	6	>6,1	<b>Resistente</b>
3	560/11	PT	38	<0,25	Susceptível	40	<0,01	Susceptível
4	561/11	PT	37	<0,25	Susceptível	39	<0,01	Susceptível
5	562/11	PT	42	<0,25	Susceptível	42	<0,01	Susceptível
6	563/11	PT	33	0,68	Susceptível	40	<0,01	Susceptível
7	564/11	PT	32	0,87	Susceptível	39	<0,01	Susceptível
8	565/11	PT	6	>165	<b>Resistente</b>	13	2,2	<b>Resistente</b>
9	566/11	PT	37	<0,25	Susceptível	41	<0,01	Susceptível
10	567/11	PT	32	0,87	Susceptível	39	<0,01	Susceptível
11	568/11	PT	33	0,68	Susceptível	38	<0,01	Susceptível
12	569/11	PT	6	>165	<b>Resistente</b>	6	>6,1	<b>Resistente</b>
13	570/11	PT	32	0,87	Susceptível	38	<0,01	Susceptível
14	571/11	PT	31	1,1	Susceptível	39	<0,01	Susceptível
15	572/11	PT	37	<0,25	Susceptível	40	<0,01	Susceptível
16	573/11	PT	28	2,4	Susceptível	33	0,03	Susceptível
17	574/11	PT	50	<0,25	Susceptível	47	<0,01	Susceptível
18	575/11	PT	6	>165	<b>Resistente</b>	6	>6,1	<b>Resistente</b>
19	576/11	PT	29	1,8	Susceptível	41	<0,01	Susceptível
20	1/12	PT	37	<0,25	Susceptível	38	<0,01	Susceptível
21	32/12	PT	6	>165	<b>Resistente</b>	6	>6,1	<b>Resistente</b>
22	39/12	PT	26	3,9	Susceptível	23	0,27	Susceptível
23	40/12	PT	30	1,4	Susceptível	37	<0,01	Susceptível
24	41/12	PT	37	<0,25	Susceptível	45	<0,01	Susceptível
25	42/12	PT	6	>165	<b>Resistente</b>	6	>6,1	<b>Resistente</b>
26	43/12	PT	37	<0,25	Susceptível	42	<0,01	Susceptível
27	46/12	PT	*			*		
28	47/12	PT	39	<0,25	Susceptível	44	<0,01	Susceptível
29	48/12	PT	32	0,87	Susceptível	37	<0,01	Susceptível
30	49/12	PT	32	0,87	Susceptível	39	<0,01	Susceptível

(Continuação do anexo 2)

Fluconazol						Voriconazol			
IC	Nº lab	OI	Dímetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade	Dímetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade	
31	51/12	PT	34	0,53	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
32	52/12	PT	34	0,53	Susceptível	34	0,03	Susceptível	
33	53/12	PT	26	3,9	Susceptível	42	<0,01	Susceptível	
34	54/12	PT	14	78	Resistente	34	0,03	Susceptível	
35	55/12	PT	14	78	Resistente	6	>6,1	Resistente	
36	56/12	PT	30	1,4	Susceptível	35	0,02	Susceptível	
37	57/12	PT	26	3,9	Susceptível	34	0,07	Susceptível	
38	58/12	PT	30	1,4	Susceptível	42	<0,01	Susceptível	
39	59/12	PT	29	1,8	Susceptível	30	<0,01	Susceptível	
40	60/12	PT	36	0,32	Susceptível	39	<0,01	Susceptível	
41	61/12	PT	32	0,87	Susceptível	38	<0,01	Susceptível	
42	62/12	PT	35	0,41	Susceptível	35	0,02	Susceptível	
43	63/12	PT	26	3,9	Susceptível	35	0,02	Susceptível	
44	64/12	PT	31	1,1	Susceptível	33	0,03	Susceptível	
45	65/12	PT	34	0,53	Susceptível	44	<0,01	Susceptível	
46	66/12	PT	48	<0,25	Susceptível	52	<0,01	Susceptível	
47	67/12	PT	30	1,4	Susceptível	39	<0,01	Susceptível	
48	68/12	PT	38	<0,25	Susceptível	40	<0,01	Susceptível	
49	69/12	PT	8	>165	Resistente	35	0,02	Susceptível	
50	77/12	PT	29	1,8	Susceptível	35	0,02	Susceptível	
51	78/12	PT	7	>165	Resistente	5	4,7	Resistente	
52	86/12	PT	46	<0,25	Susceptível	51	<0,01	Susceptível	
53	87/12	PT	35	0,41	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
54	88/12	PT	29	1,8	Susceptível	35	0,02	Susceptível	
55	89/12	PT	37	<0,25	Susceptível	40	<0,01	Susceptível	
56	90/12	PT	35	0,41	Susceptível	42	<0,01	Susceptível	
57	91/12	PT	29	1,8	Susceptível	33	0,03	Susceptível	
58	92/12	PT	34	0,53	Susceptível	36	0,02	Susceptível	
59	93/12	PT	6	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	
60	94/12	PT	43	<0,25	Susceptível	46	<0,01	Susceptível	

(Continuação do anexo 2)

IC	Nº lab	OI	Fluconazol			Voriconazol		
			Diâmetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade	Diâmetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade
61	95/12	PT	6	>165	<b>Resistente</b>	6	4,7	<b>Resistente</b>
62	96/12	PT	32	0,87	Susceptível	33	0,03	Susceptível
63	97/12	PT	28	2,4	Susceptível	34	0,03	Susceptível
64	98/12	PT	31	1,1	Susceptível	33	0,03	Susceptível
65	135/12	PT	35	0,41	Susceptível	39	<0,01	Susceptível
66	100/12	PT	29	1,8	Susceptível	31	0,05	Susceptível
67	101/12	PT	36	0,32	Susceptível	39	<0,01	Susceptível
68	102/12	PT	33	0,68	Susceptível	38	<0,01	Susceptível
69	103/12	PT	28	2,4	Susceptível	37	<0,06	Susceptível
70	104/12	PT	32	0,87	Susceptível	42	<0,01	Susceptível
71	105/12	PT	46	0,25	Susceptível	48	<0,01	Susceptível
72	106/12	PT	35	0,41	Susceptível	37	0,01	Susceptível
73	107/12	PT	41	<0,25	Susceptível	49	<0,01	Susceptível
74	108/12	PT	30	1,4	Susceptível	31	0,05	Susceptível
75	109/12	PT	6	>165	Susceptível	22	0,33	Susceptível
76	110/12	PT	31	1,1	Susceptível	34	0,03	Susceptível
77	111/12	PT	29	1,8	Susceptível	32	0,04	Susceptível
78	112/12	PT	34	0,53	Susceptível	41	<0,01	Susceptível
79	113/12	PT	28	2,4	Susceptível	31	0,05	Susceptível
80	114/12	PT	31	1,1	Susceptível	38	<0,01	Susceptível
81	115/12	PT	32	0,87	Susceptível	31	0,05	Susceptível
82	116/12	PT	29	1,8	Susceptível	31	0,05	Susceptível
83	117/12	PT	32	0,87	Susceptível	37	<0,01	Susceptível
84	118/12	PT	37	<0,25	Susceptível	46	<0,01	Susceptível
85	119/12	PT	31	1,1	Susceptível	26	0,15	Susceptível
86	120/12	PT	29	1,8	Susceptível	34	0,03	Susceptível
87	121/12	PT	18	29	<b>SDD</b>	34	0,03	Susceptível
88	122/12	PT	37	<0,25	Susceptível	40	<0,01	Susceptível
89	123/12	PT	28	2,4	Susceptível	39	<0,01	Susceptível
90	124/12	PT	29	1,8	Susceptível	31	0,05	Susceptível



(Continuação do anexo 2)

Fluconazol						Voriconazol			
IC	Nº lab	OI	Diâmetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade	Diâmetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade	
91	125/12	PT	34	0,53	Susceptível	38	<0,01	Susceptível	
92	126/12	PT	34	0,53	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
93	127/12	PT	30	1,4	Susceptível	37	0,06	Susceptível	
94	128/12	PT	32	0,87	Susceptível	39	<0,01	Susceptível	
95	129/12	PT	34	0,53	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
96	130/12	PT	29	1,8	Susceptível	31	0,05	Susceptível	
97	131/12	PT	6	>165	Resistente	32	0,02	Susceptível	
98	132/12	PT	34	0,53	Susceptível	41	<0,01	Susceptível	
99	133/12	PT	30	1,4	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
100	134/12	PT	26	3,9	Susceptível	34	0,07	Susceptível	
101	184/12	CV	31	1,1	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
102	185/12	CV	31	1,1	Susceptível	34	0,03	Susceptível	
103	186/12	CV	26	3,9	Susceptível	33	0,03	Susceptível	
104	187/12	CV	25	5	Susceptível	28	0,1	Susceptível	
105	188/12	CV	28	2,4	Susceptível	35	0,02	Susceptível	
106	189/12	CV	23	8,2	Susceptível	32	0,1	Susceptível	
107	190/12	CV	36	0,32	Susceptível	41	<0,01	Susceptível	
108	191/12	CV	29	1,8	Susceptível	34	0,03	Susceptível	
109	192/12	CV	34	0,53	Susceptível	41	<0,01	Susceptível	
110	193/12	CV	31	1,1	Susceptível	29	0,08	Susceptível	
111	194/12	CV	33	0,68	Susceptível	36	0,02	Susceptível	
112	195/12	CV	6	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	
113	196/12	CV	26	3,9	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
114	197/12	CV	6	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	
115	198/12	CV	27	3	Susceptível	33	0,08	Susceptível	
116	199/12	CV	30	1,4	Susceptível	42	<0,01	Susceptível	
117	200/12	CV	39	<0,25	Susceptível	40	<0,01	Susceptível	
118	202/12	CV	42	<0,25	Susceptível	39	<0,01	Susceptível	
119	203/12	CV	34	0,53	Susceptível	39	<0,01	Susceptível	
120	204/12	CV	37	<0,25	Susceptível	42	<0,01	Susceptível	

(Continuação do anexo 2)

Fluconazol						Voriconazol			
IC	Nº lab	OI	Diâmetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade	Diâmetro do halo (mm)	CMI	Susceptibilidade	
121	205/12	CV	30	1,4	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
122	206/12	CV	31	1,1	Susceptível	38	<0,01	Susceptível	
123	207/12	CV	38	<0,25	Susceptível	43	<0,01	Susceptível	
124	208/12	CV	30	1,4	Susceptível	39	0,01	Susceptível	
125	209/12	CV	37	<0,25	Susceptível	42	<0,01	Susceptível	
126	210/12	CV	39	<0,25	Susceptível	39	0,01	Susceptível	
127	211/12	CV	31	1,1	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
128	212/12	CV	35	0,41	Susceptível	40	<0,01	Susceptível	
129	214/12	CV	33	0,68	Susceptível	36	0,02	Susceptível	
130	215/12	CV	57	<0,25	Susceptível	54	<0,01	Susceptível	
131	216/12	CV	31	1,1	Susceptível	41	<0,01	Susceptível	
132	217/12	CV	42	<0,25	Susceptível	39	<0,01	Susceptível	
133	218/12	CV	6	>165	Resistente	6	>4,7	Resistente	
134	219/12	CV	26	3,9	Susceptível	37	<0,01	Susceptível	
135	220/12	CV	36	0,32	Susceptível	42	<0,01	Susceptível	
136	221/12	CV	*			*			
137	222/12	CV	40	<0,25	Susceptível	44	<0,01	Susceptível	
138	223/12	CV	25	5	Susceptível	42	<0,06	Susceptível	
139	224/12	CV	20	17	Susceptível	31	0,05	Susceptível	
140	225/12	CV	16	47	SDD	32	0,04	Susceptível	
141	226/12	CV	31	1,1	Susceptível	39	<0,01	Susceptível	
142	227/12	CV	31	1,1	Susceptível	39	<0,01	Susceptível	

\*Observação - Isolado não cresceu em meio de Müller-Hinton

Anexo 3 - Resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* da estirpe de *C. albicans* ATCC 90028 e dos seis isolados clínicos seleccionados (de origem portuguesa e cabo-verdiana) aos três óleos essenciais e ao extracto de grainha de toranja.

Amostra	Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )					Árvore-do-chá ( <i>Melaleuca alternifolia</i> )					Rosmaninho ( <i>Lavandula latifolia</i> )					Extracto de grainha de toranja				
	10 µL (mm)	20 µL (mm)	30 µL (mm)	40 µL (mm)		10 µL (mm)	20 µL (mm)	30 µL (mm)	40 µL (mm)		10 µL (mm)	20 µL (mm)	30 µL (mm)	40 µL (mm)		10 µL (mm)	20 µL (mm)	30 µL (mm)	40 µL (mm)	
ATCC 90028	10	11	13	15		11	13	14	15		11	14	14	14		0	0	0	0	
8	0	0	0	0		10	10	11	11		11	11	11	11		0	0	7	7	
49	8	9	11	12		15	15	15	16		12	15	15	16		0	0	0	0	
61	19	19	20	22		14	20	37	40		25	29	35	40		0	0	0	0	
112	9	14	14	15		18	18	19	19		12	17	17	17		0	0	0	0	
114	8	14	15	15		14	15	15	16		13	15	16	15		0	0	0	0	
133	7	8	10	8		19	19	22	22		8	11	11	11		0	0	0	0	
IC-PT																				
IC-CV																				



Anexo 4



Figura A4.1-Bandas resultantes da amplificação por PCR multiplex dos isolados provenientes de Portugal. 1-Marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA 100 pb, 2-*C. albicans* ATCC90028, 3-*C. albicans* (n°40), 5-*C. lusitana* (n°71), 6-*C. albicans* (n°72), 7-*C. albicans* (n°75), 9-*C. albicans* (n°94), 10-*C. albicans* (n°96), 11-*C. albicans* (n°99) e 12-controlo negativo.

Figura A4.2-Bandas resultantes da amplificação por PCR multiplex dos isolados provenientes de Cabo-Verde. 1-Marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA 100 pb, 2-*C. albicans* ATCC90028, 3-*C. glabrata* (n°133), 4-*C. albicans* (n°134), 5-*C. albicans* (n°135), 6-*C. albicans* (n°136), 7-*C. albicans* (n°137), 8-*C. glabrata* (n°138), 9-*C. albicans* (n°139), 10-*C. parapsilosis* (n°140), 11-*C. parapsilosis* (n°141) e 12-*C. albicans* (n°142).

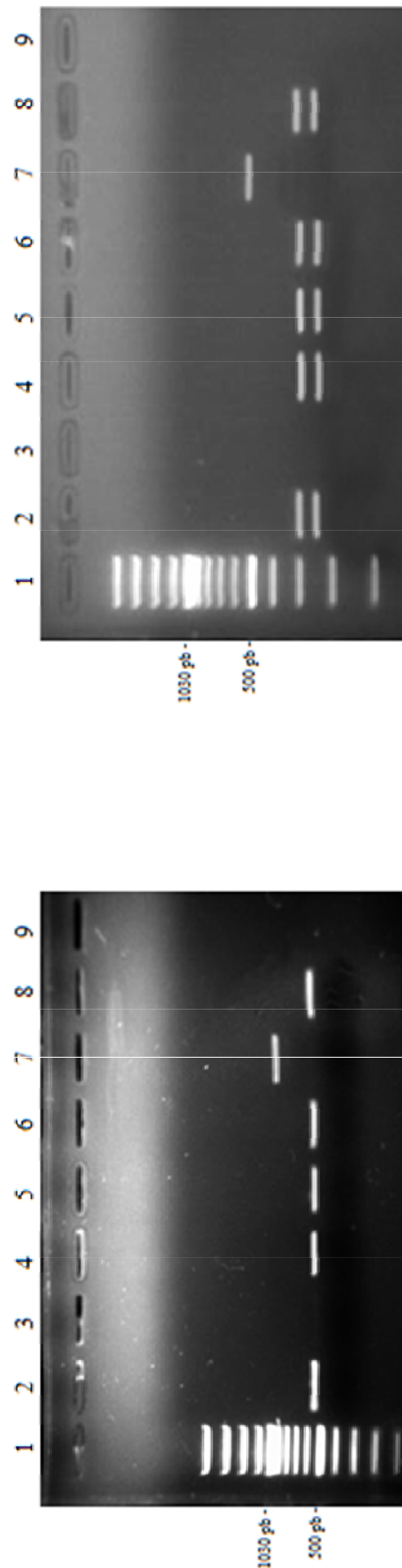


Figura A4.3-Bandas resultantes da amplificação por PCR-RFLP dos isolados provenientes de Portugal e Cabo-Verde. 1-Marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA 100 pb, 2-ATCC90028, 3-Isolado n°127, 4-Isolado n°3, 5-Isolado n°18, 6-Isolado n°19, 7-Isolado n°20, 8-Isolado n°22, 9-controlo negativo.

Figura A4.4-Bandas resultantes restrição com a enzima *Msp*I dos isolados provenientes de Portugal e Cabo-Verde. 1-Marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA 100 pb, 2-ATCC90028, 3-Sem bandas (n°127), 4-*C. albicans* (n°3), 5-*C. albicans* (n°18), 6-*C. albicans* (n°19), 7-*C. parapsilosis* (n°20), 8-*C. albicans* (n°22), 9-controlo negativo.